

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude du phénotype d'agrégation d'un mutant du quorum sensing chez *Brucella Melitensis* 16 M

Godefroid, Marie

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU PHENOTYPE D'AGREGATION CHEZ UN MUTANT
DU QUORUM SENSING CHEZ *BRUCELLA MELITENSIS* 16M**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Marie GODEFROID
Juin 2005

Avant de présenter ce qui m'a préoccupé ces six derniers mois, je tenais à remercier tout ceux qui ont contribué, à leur façon, à la réalisation de ce mémoire.

Je commencerai bien évidemment par remercier le professeur Jean-Jacques Letesson, le grand schtroumpf de ce laboratoire, pour son accueil et pour m'avoir attribué un sujet de mémoire aussi passionnant.

Je remercie aussi le professeur Xavier De Bolle, le co-promoteur de ce mémoire.

Je tiens à remercier Sophie, ma chère tutrice, sans qui je n'aurais pas pu réaliser le millionième de ce mémoire. Ce fut une première pour toi, mais je souhaite aux suivants que ce ne soit pas la dernière ! Tu as été exemplaire, y as mis tout ton cœur, mais maintenant c'est moi qui à mon tour te remercie du fond du cœur.

Je ne voudrais pas oublier de remercier le professeur Pierre Van Cutsem ainsi que Pierre Cambier (URBV) pour leur précieuse coopération dans mon extraction des exopolysaccharides. J'espère que je n'ai pas causé une pénurie de membranes à dialyse !

J'aimerais remercier tous les Urbmiens pour leur accueil, leurs conseils, leur disponibilité et leurs encouragements : Régis, Johann (pfff une simple sous-merde ☺), Grande Marie, Petite Marie, Zette, Rose-May, Rosse Mary, Tonton Etienne, Papy Christian, Sandrine, Virginie, Alex et Richard. Un merci avec mention spéciale pour les deux noctambules du labo Jon et Nico (rendez-vous au prochain bunker ?) et au génie de l'informatique, Julien. Je n'oublierai pas non plus l'équipe GEMO, ni Caroline, Chantal, Valérie, Anne-Marie et enfin Monique, qui a dû se demander ce que je pouvais bien faire avec toutes ces éprouvettes !

Je remercie aussi les occupants de « mon couloir » et plus spécialement Olivia (Miss Cauette), Bruno et Sylvie. Mille mercis à Ben (Jean-Jacques Junior) et Fabrice pour tous les compliments qu'ils auront pu m'adresser !

Merci d'avance à Marie Delory et aux professeurs Olivier De Backer, Carine Michiels et Patsy Renard, les membres du jury, pour le temps ô combien précieux que vous allez consacrer à la lecture critique de ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier les bios de cette promotion 2004-2005. Bonne chance à vous tous ! Comment oublier les bio humaines ?? Aude (Bêêêêêê), Bérengère, Carotte, Céline (merci pour toutes les soirées passées à ton kot, tes pâtes aux scampis et bisou au lapinou ☺), Cindy, Séraphine, Virginie et bien sûr Nanoflo (Gilberte ? Léocadie ? Suzanne ?) que je suis certaine de revoir très souvent (et ça me fait plaisir hein !). Bon courage à toutes !

Un encouragement plus spécial à Jenny (pour nos longues discussions de compassion et les montées d'adrénaline), Géraldine et Maxou (deux Bostoniens que j'apprécie beaucoup).

Je terminerai par remercier au moins mille fois ceux qui contribuent à mon épanouissement et que je ne voudrais perdre pour rien au monde.

Mes parents : pour avoir fait de moi une fille aussi formidable ☺ et pour toutes les libertés qu'ils m'ont toujours laissées. Voilà, un mémoire c'est ce que vous tenez entre vos mains ; je veux un résumé pour demain !

Ma famille : ce n'est pas la quantité, mais la qualité qui compte !! Merci surtout à Pierre pour tous les cours particuliers qu'il a accepté de me donner ☺ !!

Mes Z'amis, à qui je n'ai pas su consacrer beaucoup de temps ces derniers mois : merci pour votre fidélité ! Grégo et Christelle vous êtes deux personnes formidables (si, si... je l'avoue, je l'avoue !). Merci aussi à Marie-Aurore, Xavier (mon précieux), Mamy Carrefour, Ren et tous les autres.

Remercions enfin Julien (mais pas de trop quand même ☺) d'avoir supporté « mon sale caractère » ces deux dernières années. J'espère que nous en vivrons encore de nombreuses !

Table des matières

INTRODUCTION	2
1. ..AVANT-PROPOS	2
2. LE QUORUM SENSING	2
2.1 <i>Définition</i>	2
2.2 <i>Les différents types de langage chez les bactéries</i>	3
2.2.1. Communication intra espèces (AI-1)	3
2.2.1.1 Chez les bactéries à Gram positif	3
2.2.1.2 Chez les bactéries à Gram négatif.....	3
a) Les AHLs	4
b) Les synthétases.....	4
c) Les régulateurs	5
d) Les cibles des régulateurs transcriptionnels de type LuxR	6
e) Les réseaux de Quorum Sensing.....	6
2.2.2. Communication interspécifique (AI-2)	6
2.2.3. Communication bactéries-cellules eucaryotes	7
2.2.4. Bactéries polyglottes.....	7
2.3 <i>Les stratégies d'interférence</i>	8
2.4 <i>Exemples concrets illustrant l'intérêt des langages bactériens</i>	9
2.4.1. Le Quorum Sensing dans les relations symbiotiques illustré par <i>Sinorhizobium meliloti</i>	9
2.4.2. Rôle du Quorum Sensing dans la virulence	9
2.4.2.1 <i>Erwinia carotovora</i>	9
2.4.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
3. LES BIOFILMS	10
3.1 <i>Définition</i>	10
3.2 <i>La formation des biofilms</i>	11
3.2.1 Attachement.....	11
3.2.2 Maturation	11
3.2.3 Dislocation.....	11
3.3 <i>Les fonctions des biofilms</i>	12
3.4 <i>Composition de la matrice extracellulaire</i>	13
3.4.1. Polysaccharides	13
3.4.2. Protéines.....	14
3.4.3. Acides nucléiques et mort cellulaire	14
3.4.4. Agents stabilisants et altérateurs de la matrice.....	14

3.5	<i>Biofilms et Quorum Sensing</i>	15
4.	LE GENRE <i>BRUCELLA</i> ET LA BRUCELLOSE	17
4.1	<i>Généralités</i>	17
4.2	<i>Caractéristiques microbiologiques et génétiques</i>	17
4.3	<i>La brucellose</i>	17
4.4	<i>Mécanismes d'infection de Brucella</i>	18
4.5	<i>Le Quorum Sensing chez Brucella melitensis</i>	19
4.5.1	Les AHLs	19
4.5.2	La synthétase	19
4.5.3	Les régulateurs du Quorum sensing	19
4.5.4	Les cibles de VjbR et BabR	19
	OBJECTIFS DU MEMOIRE	21
	RESULTATS	23
	A. CARACTERISATION DU PHENOTYPE D'AGREGATION	23
1.	MUTAGENESE DU GENE <i>VJBR</i> ET COMPLEMENTATIONS	23
2.	ETUDE DU PHENOTYPE D'AGREGATION CHEZ <i>BRUCELLA ABORTUS</i>	24
3.	ETUDE CINETIQUE DE FORMATION DES AGREGATS	26
4.	OBSERVATION DES AGREGATS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	26
	B. ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES IMPLIQUES DANS LE PHENOTYPE D'AGREGATION	28
1.	MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'EPS	28
1.1	<i>Marquages au rouge congo</i>	28
1.2	<i>Marquages au calcofluor</i>	30
1.3	<i>Test de viabilité au sein des agrégats</i>	31
1.4	<i>Marquages au cristal violet</i>	31
1.5	<i>Synthèse des tests de coloration</i>	33
1.6	<i>Marquage du polysaccharide par la concanavaline A-FITC</i>	33

2. MUTAGENÈSE PAR INTÉGRATION DISRUPTIVE DE TROIS GENES DU LOCUS DE 25 KB 34

2.1 Construction des plasmides de disruption *pSKoriT-exoA*, *pSKoriT-exoT* et *pSKoriT-omp31* 35

- Amplification des régions internes des gènes *exoA*, *exoT* et *omp31* 36
- Linéarisation du *pSKoriT-cat* 36
- Clonage des amplicons dans le *pSKoriT-cat* 36
- Analyse des clones recombinants 36
- Détermination du sens de l'insert par rapport au promoteur de *lacZ'* 36

2.2 Obtention de disruptants chez les *B. melitensis* $\Delta vjbR$ 37

2.3 Construction des plasmides de complémentation *pMR10 nat vjbR*, *pMR10 nat HTH* et *pMR10 nat D82A* 38

- Obtention du gène *nat* 38
- Linéarisation des *pMR10* porteurs d'un allèle *vjbR* 38
- Clonage du gène *nat* dans les *pMR10* 39
- Analyse des clones recombinants 39

2.4 Observation du phénotype des disruptants 39

3. EXTRACTION DES EPS DE *BRUCELLA MELITENSIS* 16M 39

3.1 Purification de l'exopolysaccharide 39

3.2 Détermination de la concentration en sucres de chaque échantillon 40

3.3 Vérification de la pureté des échantillons par dot blots 40

3.4 Hydrolyse acide des échantillons et HPLC 41

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 44

A. CARACTERISATION DU PHÉNOTYPE D'AGREGATION 44

1. ETUDE DU PHÉNOTYPE D'AGREGATION CHEZ *B. ABORTUS* ... 44

2. OBSERVATION DES AGREGATS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE 44

- ADN 45
- Cellulose 45
- L'étrange ressemblance avec l'appendice d'*Hyphomonas adhaerens* 46

3. CONCLUSION 47

4. PERSPECTIVES 47

B.. ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES IMPLIQUES DANS LE PHENOTYPE D'AGREGATION 47

1. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'EXOPOLYSACCHARIDES

- Marquages au rouge congo47
- Marquages au calcofluor 48
- Marquages au cristal violet 48
- Marquages à la concanavaline A-FITC 48

2. MUTAGENESE PAR INTEGRATION DISRUPTIVE DE TROIS GENES DU LOCUS DE 25 kb 49

3. EXTRACTION DES EPS DE *BRUCELLA MELITENSIS* 16M..... 49

4. CONCLUSION 50

5. HYPOTHESES QUANT À LA FONCTION DES BIOFILMS FORMES PAR *BRUCELLA MELITENSIS* 16M 50

- Le rôle protecteur des biofilms dans le milieu naturel..... 50
- Le rôle d'attachement des biofilms dans le milieu naturel 50
- Le rôle protecteur des biofilms dans l'organisme hôte 51
- Le rôle d'attachement des biofilms dans l'organisme hôte 51

6. PERSPECTIVES..... 51

MATERIEL ET METHODES..... 53

1. MATERIEL..... 53

1.1 Solutions et milieux 53

1.1.1 Solutions d'antibiotiques et autres 53

1.1.2 Milieux de culture 53

1.1.2.1 Milieu riche pour *E. coli* : milieu LB 53

1.1.2.2 Milieu riche pour *Brucella* : milieu 2YT..... 53

1.2 Souches bactériennes et plasmides 54

2. METHODES 54

2.1 Techniques de biologie moléculaire..... 54

2.1.1 Extraction d'ADN plasmidique..... 54

2.1.2 Restriction d'ADN plasmidique purifié..... 54

2.1.3 Filling 55

2.1.4 Ligation 55

2.1.5 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose 55

2.1.6 Purification sur gel d'agarose 56

2.1.7	Polymerase chain reaction (PCR).....	56
2.1.8	La conjugaison bactérienne.....	57
2.1.9	Transformation de bactéries CaCl ₂ compétentes.....	58
2.2	<i>Techniques immunologiques</i>	58
2.2.1	Préparation d'extraits protéiques totaux	58
2.2.2	Dosage protéique BCA	58
2.2.3	La technique du Western blot.....	59
2.2.3.1	Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant.....	59
2.2.3.2	Préparation et chargement des échantillons	59
2.2.3.3	Migration.....	60
2.2.3.4	Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	60
2.2.3.5	Immunodétection	60
2.2.4	La technique du dot blot.....	61
2.3	<i>Techniques de microscopie</i>	61
2.3.1	Préparation des extraits pour la microscopie électronique à balayage.....	61
2.3.1.1	Fixation des bactéries sur le support choisi.....	61
2.3.1.2	Déshydratation des échantillons	61
2.3.1.3	Point critique des échantillons	61
2.3.1.4	Dépôt d'or sur les échantillons	62
2.3.2	Préparation des extraits pour la microscopie à fluorescence	62
2.3.3	Préparation des extraits pour la microscopie confocale.....	62
2.4	<i>Techniques relatives à l'étude des biofilms</i>	63
2.4.1	Test d'adhérence	63
2.4.2	Extraction des exopolysaccharides de <i>Brucella</i>	63
2.4.3	Dosage des sucres par la méthode de Dubois	64
2.4.4	Test live/dead	64
2.5	<i>Annexes</i>	
2.5.1	Principe de la microscopie à fluorescence	
2.5.2	Principe de la microscopie confocale	
2.5.3	Principe de la microscopie électronique à balayage	
2.5.4	Test blanc/bleu	
2.5.5	Protocole de minipréparations d'ADN plasmidique	
2.5.6	Protocole de la purification sur gel d'agarose	

Table des abréviations

Abréviation	Nom complet
2YT	2 x Yeast Extract
Ac	Anticorps
ACP	Acyl carrier protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acyl-homosérine lactone
AI	Auto-inducteur
BSA	Serum albumine bovin
<i>bla</i>	β -lactamase
<i>cat</i>	Chloramphénicol-acétyltransférase
Cm	Chloramphénicol
Da	Dalton
DAPI	4', 6-diamidino-2-phénylindol
dNTP	désoxyribonucléotide
DO	Densité optique
EPS	Exopolysaccharides
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
HSL	Homosérine lactone
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycine
kb	kilobase
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
Mb	Mégabase
MCS	Site multiple de clonage
MEB	Microscopie électronique à balayage
Nal	Acide nalidixique
<i>nat</i>	Nourséothricine acétyl transférase
Nou	Nourcéothricine
Omp	Outer Membrane Protein
pb	paire de base
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
QS	Quorum Sensing
rpm	Rotation par minute
SAM	S-adénosyl méthionine
SDS	sodium Dodécyl Sulfate
TLC	Thin layer chromatography
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β D-galactopyranoside

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Avant-propos

Depuis les débuts de la vie, l'histoire nous a souvent prouvé que sans un regroupement des individus et sans une bonne communication entre ceux-ci, la survie en milieu hostile est presque impossible. Pour voir apparaître un regroupement et une communication, il faut que les individus poursuivent un même but, qu'ils aient la même volonté. Les bactéries n'échappent pas à la règle. Contrairement à la vie en laboratoire où tous les besoins des bactéries sont satisfaits et où vivre ne demande aucun effort, la croissance de ces mêmes bactéries dans le milieu naturel n'est pas sans contraintes. Elles doivent faire face aux stress environnementaux ainsi qu'à la concurrence féroce d'autres espèces. En effet, dans le milieu naturel, les ressources sont souvent limitées ; dès lors, la lutte pour la survie prend tout son sens. Dans une telle situation, quel meilleur moyen pour survivre que de se regrouper pour tenter de contrer les difficultés propres au milieu ? C'est ce que font les bactéries qui se rassemblent en un ensemble proche de la multicellularité appelé biofilm. Cette multicellularité implique souvent une forme particulière de communication que l'homme ne découvrit qu'en 1970. Cette année-là, l'homme découvre que les bactéries sont capables de « parler » ou du moins de communiquer. En effet, ces micro-organismes, paraissant primitifs au premier abord, perçoivent leurs congénères et sont capables de s'adapter à leur présence. Aujourd'hui, un nombre croissant de microbiologistes tentent de comprendre quel vocabulaire est utilisé, comment se déroulent ces conversations microbiennes, ce qu'il s'y dit, et surtout comment y mettre fin. En effet, ce bavardage leur permet, entre autres, d'élaborer des stratégies pour coloniser leurs hôtes (pathogène ou symbiotique) le plus discrètement possible. Les bactéries seraient-elles plus bavardes que nous ?

2. Le Quorum Sensing

2.1 Définition

Le Quorum Sensing (QS) est un système de communication bactérien permettant la régulation de l'expression de gènes en réponse aux fluctuations de la taille de la population (Fuqua et al., 1994). Ce système est basé sur la synthèse, l'émission et la détection de phéromones (ou autoinducteurs) qui s'accumulent dans l'environnement lorsque la densité cellulaire augmente ou se trouve dans un environnement confiné (Vannini et al., 2004). La production de ces phéromones a lieu à des stades de croissance spécifiques ou en réponse à des changements environnementaux. Plus les bactéries abondent, plus les phéromones produites s'accumulent. Lorsqu'une densité de population seuil, ou quorum, est atteinte (c'est-à-dire quand suffisamment de phéromones sont accumulées dans le milieu), les bactéries initient une réponse concertée en régulant certains gènes via un ou plusieurs régulateur(s) transcriptionnel(s) capable(s) de lier la phéromone.

Découvert au début des années 70 par l'équipe de Mr. Hastings, le QS chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* est devenu un paradigme (Nealson, 1977). Ce système sera l'exemple clé de cette introduction. Cette bactérie a deux modes de vie. Cette bactérie vit dans l'eau de mer en faible densité bactérienne où elle n'est pas luminescente, mais peut également établir une relation symbiotique avec certains poissons et calamars (dont *Euprymna scolopes*). Elles s'accumulent alors dans une poche luminescente pour se retrouver en forte densité de population, ce qui leur permet alors la production d'une lumière bleue-verte émise en-dessous de l'hôte (Visick et al., 2000). Le calamar *E. scolopes* chasse la nuit et il apparaît bioluminescent notamment dans les environnements obscurs, grâce au maintien des populations de *V. fischeri* en haute densité dans une poche lumineuse adaptée (figure 1). Celle-ci fournit un apport en

nutriment sûr aux bactéries. En retour, *E. scolopes* exploite le phénotype de bioluminescence soit pour attirer ses proies, soit pour effrayer ses prédateurs. Une dernière possibilité est que la lumière émise par les bactéries mime celle de la lune, ce qui neutralise l'ombre du calamar qui devient alors invisible pour les prédateurs.

Depuis lors, différentes phéromones impliquées dans d'autres types de langages bactériens ont été mises en évidence.

2.2 Les différents types de langage chez les bactéries

Actuellement, trois types de langage bactériens ont été mis en évidence : la communication intra espèces via les autoinducteurs AI-1 (un oligopeptide chez les bactéries à Gram positif ou une acyl-homosérine lactone (AHL) chez celles à Gram négatif), la communication inter espèces via les autoinducteurs AI-2 et la communication avec les cellules eucaryotes via les autoinducteurs AI-3. Cependant, cette classification est arbitraire, puisque les AHLs d'une espèce peuvent parfois être reconnues par d'autres espèces que celle qui l'a émise.

2.2.1 Communication intra-espèces (AI-1)

Les bactéries perçoivent la densité de leur population en détectant la concentration de petites molécules signal diffusibles. La communication AI-1 permet le dialogue entre des bactéries de même espèce et fonctionne différemment chez les bactéries à Gram négatif et chez les bactéries à Gram positif. Néanmoins, la notion « intra-espèces » sera revue plus bas.

2.2.1.1 Chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, la phéromone est un oligopeptide (Kleerebezem et al., 1997) (Lazazzera et al., 1998). La membrane des bactéries étant imperméable aux oligopeptides, des transporteurs ABC (ATP binding cassette) se chargent du transport de ces molécules signal dans le milieu extérieur (figure 2). Lorsque la concentration seuil est atteinte, un système de transduction du signal à deux composants régule l'expression de gènes cibles : l'AI-1 se fixe sur le domaine extracellulaire du senseur du système et celui-ci phosphoryle en retour le régulateur via son domaine histidine kinase cytoplasmique. Cette phosphorylation change la conformation du régulateur, qui peut alors se lier à l'ADN pour modifier l'expression de gènes cibles, comme par exemple des gènes de virulence chez *S. aureus* ou des gènes de sporulation et de compétence chez *B. subtilis* (Miller et al., 2001).

2.2.1.2 Chez les bactéries à Gram négatif

Les micro-organismes à Gram négatif utilisent principalement des acyl-homosérine lactones (AHLs) comme molécules signal. C'est le cas de *V. fischeri* qui possède un système de QS basé sur les protéines LuxI, LuxR et sur la 3-oxo-C₆-HSL. Dans cet organisme modèle, la synthase LuxI produit la 3-oxo-C₆-HSL qui peut diffuser librement au travers de la membrane bactérienne (figure 3). La concentration cytoplasmique en AHL égale donc à tout moment la concentration extracellulaire environnant la bactérie et augmente proportionnellement avec la densité de la population (Kaplan et al., 1985).

A faible densité de population, un taux basal de transcription de l'opéron *lux* assure la production d'une faible quantité de phéromones, insuffisante pour induire la bioluminescence. Pour que la population bactérienne atteigne une densité suffisante, les bactéries doivent croître dans un environnement confiné ou attendre que son entourage se peuple pour accumuler suffisamment de phéromones. Lorsque les AHLs atteignent une concentration qui occupe 50% des récepteurs, le quorum est atteint et la 3-oxo-C₆-HSL se lie à LuxR (Fuqua et al., 1996). La fixation de l'AHL sur LuxR entraîne des changements conformationnels qui rendent le régulateur actif pour la liaison à l'ADN (figure 3). Suite à l'interaction AHL-LuxR, LuxR, activateur transcriptionnel, se lie à des éléments spécifiques du promoteur de l'opéron *lux* (*lux box*) pour en augmenter l'expression. Cet opéron comprend les gènes codant pour l'AHL

synthétase LuxI ainsi que les gènes nécessaires pour la bioluminescence. Lorsqu'il est activé, l'opéron *lux* crée une boucle de rétroaction positive qui est suivie par l'apparition de luminescence. La densité cellulaire doit diminuer considérablement avant que le niveau de transcription de l'opéron *lux* ne retourne à un niveau d'expression basal (Greenberg, 1997).

Un système de QS chez les bactéries Gram négatives nécessite donc quatre éléments pour fonctionner : une AHL synthétase, une AHL (ou encore AI-1 ou phéromone), un régulateur transcriptionnel capable de fixer les AHLs et des gènes cibles ayant des sites de reconnaissance pour le régulateur dans leur région promotrice (Lazdunski et al., 2004). Nous allons détailler chacun de ces éléments dans la suite de cette introduction.

La plupart des bactéries Gram négatives ont des systèmes de QS de type LuxI/LuxR. Les protéines de type LuxI produisent des phéromones spécifiques de type AHL. Chaque espèce produit une ou plusieurs AHL(s) suivant le nombre de synthétases qu'elle possède.

a) Les AHLs

Les AHLs sont composées d'un groupe homosérine lactone (HSL) sur lequel est greffée une chaîne acyle de taille variable (de 4 à 18 carbones). Le troisième atome de carbone de la chaîne acyle peut être substitué par un groupement hydroxyle, oxo ou un hydrogène (figure 4). Il existe aussi des AHLs à chaîne acyle insaturée.

Les AHLs sont des molécules amphiphiles, puisque les groupements HSL sont hydrophiles et la chaîne acyle est hydrophobe. Cette amphiphilie permet sans doute aux AHLs de traverser la membrane plasmique des bactéries et de voyager entre les environnements extracellulaire et intracellulaire. La longueur de la chaîne acyle et les modifications chimiques sur le troisième carbone fournissent la spécificité aux signaux du QS. De plus, certaines bactéries produisent plus d'une AHL et différents organismes peuvent produire la même AHL. A cause de cela, il existe probablement des chevauchements dans la production et la reconnaissance des AHLs par des organismes différents.

La diffusion simple ne semble pas suffire pour exporter les AHLs à longue chaîne acyle. D'ailleurs, un transport actif a été mis en évidence chez *P.aeruginosa* : l'opéron *mexAB-OrpM* codant pour une pompe de la famille des transporteurs d'antibiotiques. Sans cette pompe, la 3-oxo-C₁₂-HSL ne peut être exportée et s'accumule donc dans la bactérie et ne peut être exportée (Pearson et al., 1999).

La concentration en AHLs varie selon la densité de la population bactérienne ; cependant, d'autres facteurs peuvent influencer l'accumulation des AHLs dans le milieu. L'agrégation bactérienne, la formation de biofilms et les confinements jouent sur la concentration locale en AHLs. Des conditions de pH extrêmes peuvent faire baisser la concentration d'AHLs disponibles pour lier les régulateurs de type LuxR. De plus, certains micro-organismes produisent des enzymes comme la lactonase ou l'acylase, pouvant cliver les AHLs et donc interférer avec les systèmes de QS (Dong et al., 2000).

b) Les synthétases

Il existe au moins deux types de synthétases : les synthétases de type LuxI et celles de type LuxM/AinS. Il existerait une troisième famille de type HdtS.

Les synthétases de type LuxI produisent les AHLs à partir de deux substrats : une Acyl Carrier Protein (ACP) portant une chaîne acyle dérivée du métabolisme des acides gras et la S-adenosylméthionine (SAM) qui fournit une HSL (figure 5). La SAM se lie au site actif de LuxI et le groupement acyl de l'acyl-ACP est alors transféré à ce complexe néoformé (figure 5). Le groupement acyl forme alors un lien amide avec le groupement aminé de la SAM. La lactonisation subséquente engendre l'AHL et le sous-produit 5'méthylthioadénosine (Parsek et al., 1999).

Des acides aminés C-terminaux conservés chez les synthétases de type LuxI sont nécessaires pour sélectionner l'acyl-ACP nécessaire pour former l'AHL (Hanzelka et al., 1997).

Une autre famille d'AHL synthétases a été décrite chez deux espèces du genre *Vibrio* : AinS chez *V. fischeri* et LuxM chez *V. harveyi*. Puisque LuxM ne présente pas d'homologie de séquence avec d'autres synthétases que AinS, elles sont classées toutes deux dans une nouvelle famille : la famille LuxM/AinS (Gilson et al., 1995). Ces dernières dirigent la synthèse de la 3-hydroxy-C₄-HSL et de la C₈-HSL respectivement. AinS catalyse la synthèse de la C₈-HSL à partir de l'anneau HSL amené par la SAM et d'une chaîne acyle à huit atomes de carbones pouvant provenir d'une ACP (l'octanoyl-ACP en l'occurrence) ou de l'octanoyl coenzymeA (Hanzelka et al., 1999). Ceci diffère des synthétases de type LuxI qui utilisent l'acyle-ACP comme source unique de chaîne acyle. C'est pourquoi, on suppose qu'AinS régule l'opéron *lux* via la C₈-HSL dans les conditions qui ne permettent pas à LuxI de synthétiser la 3-oxo-C₆-HSL.

L'enzyme HdtS a été détectée chez *Pseudomonas fluorescens* F113. Il a été décrit qu'elle dirigerait la production de trois AHLs : la 3-hydroxy-C₁₄-HSL, la C₁₀-HSL et la C₆-HSL. Cette enzyme transférerait des chaînes acyles à la SAM à partir de l'acyl-ACP ou de l'acyl-coA (Laue et al., 2000). Savoir si HdtS constitue un troisième type de synthétase est actuellement sujet à controverse. Cependant, il n'a pas été démontré que les homologues d'HdtS chez d'autres bactéries constituent des synthèses d'AHLs.

c) Les régulateurs

Chez *V. fischeri*, le régulateur transcriptionnel du QS est LuxR. Ce régulateur est capable de lier des AHLs et de modifier l'expression des gènes cibles. LuxR est un polypeptide de 250 acides aminés qui se localise à la face cytoplasmique de la membrane interne de *V. fischeri*. LuxR a donné son nom à une famille de régulateurs (les régulateurs de type LuxR), qui ne présentent que 18 à 25% d'identité entre eux, pour une longueur moyenne de 250 acides aminés.

Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR sont constitués de trois domaines fonctionnels: un domaine amino terminal de liaison aux AHLs, un domaine qui médie l'oligomérisation de la protéine (LuxR agit sous forme dimérique) et un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice (HTH), impliqué dans la régulation transcriptionnelle.

Les interactions AHL-LuxR sont très spécifiques. D'ailleurs, trois acides aminés très conservés chez les régulateurs de type LuxR sont impliqués dans la liaison directe de l'AHL : le tryptophane 57 (pour le 57^{ème} acide aminé de la protéine), la tyrosine 61 et l'aspartate 70 (Vannini et al., 2002). En absence de phéromones, le domaine amino-terminal interfère avec le domaine de liaison à l'ADN carboxy-terminal (les 90 derniers acides aminés).

Quant au domaine de dimérisation, l'étude cristallographique de TraR (le régulateur transcriptionnel de type LuxR chez *Agrobacterium tumefaciens*) montre que TraR se lie à son ADN cible (*tra box*) sous forme dimérique, lié à la C₈-HSL. Les acides aminés 49 à 156 constitueraient le domaine de dimérisation (Qin et al., 2000), (Zhu et al., 2001). La liaison de l'AHL à son régulateur transcriptionnel provoque un changement conformationnel permettant au régulateur d'oligomériser.

Il existe trois types de régulateurs transcriptionnels : des activateurs de transcription liant l'ADN en présence d'AHL et deux sortes de répresseurs liant l'ADN en absence d'AHL. LuxR de *V. fischeri*, TraR d'*A. tumefaciens* ou CarR d'*Erwinia carotovora* constituent des exemples d'activateurs de transcription. La liaison de leur AHL leur permet de dimériser et d'aller lier les éléments ADN de type *lux box* pour activer la transcription.

Les répresseurs, quant à eux, lient l'ADN sous forme dimérique en absence d'AHL. Leur liaison à l'ADN ferme l'accès à l'ARN polymérase et empêche donc toute transcription des gènes cibles. En présence d'AHL, les répresseurs se comportent de deux manières différentes. D'une part, EsaR de *Pantoea stewartii* change de conformation après avoir lié son AHL, ce qui

déclenche la libération du promoteur et l'accès de la polymérase à l'ADN (Qin et al., 2000) (von Bodman et al., 1998). D'autre part, CarR d' *E. carotovora* reste lié à l'ADN en présence d'AHL. En effet, la liaison des AHLs à CarR engendre la tétramérisation de ce régulateur, forme capable d'initier la transcription des gènes cibles (Welch et al., 2000).

d) Les cibles des régulateurs transcriptionnels de type LuxR

La forme dimérique du régulateur lie l'ADN via son domaine C-terminal de liaison à l'ADN (Choi et al., 1992). Le dimère se fixe au niveau du promoteur sur une région de séquence inversée généralement constituée de 18 à 22 paires de bases et que l'on appelle « lux box ». La plupart des gènes cibles des régulateurs du QS contiennent une *lux box* au sein de leur promoteur, mais il existerait certaines cibles sans cet élément. La liaison des régulateurs sur ces sites consensus facilite la liaison de l'ARN polymérase au promoteur cible, ce qui mène à l'activation de la transcription (Stevens et al., 1999).

Certains acides aminés du domaine C-terminal participent à la liaison à la *lux box* tandis que d'autres recrutent la polymérase. Certains régulateurs, comme LuxR, seraient des facteurs de transcription ambidextres, puisqu'ils initieraient la transcription des gènes en aval et en amont des éléments d'ADN de type *lux box*. Des exemples de gènes ciblés par les régulateurs du QS sont présentés dans le tableau 1.

e) Les réseaux de QS

Récemment, on a découvert que certains systèmes de QS appartiennent à des réseaux de régulation. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, la régulation dépendante des AHLs est hiérarchisée. Deux systèmes sont présents : LasI/LasR et RhII/RhlR (figure 6). Chacune des deux synthétases (LasI et RhII) synthétise une AHL différente qui est reconnue par le régulateur transcriptionnel associé (LasR et RhlR respectivement). Ces deux circuits de régulation agissent en cascade pour contrôler l'expression de certains facteurs de virulence nécessaires à l'infection. Le système LasI/LasR exerce un contrôle transcriptionnel positif sur le système RhII/RhlR (figure 6). Dans le système *las*, la 3-oxo-C₁₂-HSL est synthétisée par LasI. L'une des fonctions de cette AHL est d'interagir avec LasR aux fortes densités de population pour activer la transcription des gènes de virulence, de *lasI* (ce qui établit une boucle d'autorégulation positive) et de *rhlR*. L'expression du second système de QS est ainsi induite. RhlR lie la C₄-HSL produite par RhII.

Cependant, la régulation du QS chez *P. aeruginosa* est encore bien plus complexe que cela : une autre phéromone a récemment été identifiée et démontrée impliquée dans le QS chez cette bactérie. Il ne s'agit pas d'une AHL, mais d'une 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (ou PQS) (figure 7). Cette PQS est un lien supplémentaire entre les circuits *las* et *rhl* : on suppose que PQS initie la cascade *rhl* en autorisant la production de la C₄-HSL seulement après avoir allumé la cascade de LasI/LasR (voir figure 7) (Pesci et al., 1999, Pesci et al., 1997).

2.2.2 Communication interspécifique (AI 2)

La communication AI-2 permet le dialogue entre bactéries d'espèces différentes, qu'elles soient Gram positives ou Gram négatives! De par ces caractéristiques, ce type de communication a été surnommé « esperanto bactérien ». La molécule signal utilisée dans ce type de communication est une furanosyl borate diester (Chen et al., 2002) (figure 8). Cette molécule a été caractérisée chimiquement chez *Salmonella typhimurium* et chez *Vibrio harveyi*. Chez la bactérie *V. harveyi*, deux systèmes de QS indépendants existent. Chaque circuit synthétise, détecte et répond à une phéromone pour contrôler la production de bioluminescence : l'un fonctionne avec une AHL, l'autre avec l'AI-2. La communication via l'AI-2 permettrait à une espèce de bactérie de détecter la présence d'espèces étrangères et d'y réagir. Chez *V. harveyi*, il a été montré que l'enzyme LuxS est responsable de la synthèse de l'AI-2. Des homologues de LuxS ont été mis en évidence chez la plupart des bactéries synthétisant l'AI-2. La transduction

du signal AI-2 fait intervenir un système à deux composants mais peu de choses sont connues concernant la façon dont ce signal est détecté et de quelle manière il influence la transcription de gènes. Néanmoins, on sait que l'AI-2 est impliqué dans l'induction de la bioluminescence chez *V. harveyi* et dans le contrôle de la virulence chez *E. coli* entéropathogène et chez *E. coli* entérohémorragique.

2.2.3 Communication bactéries-cellules eucaryotes

Les AHLs sont également perçues par les cellules eucaryotes et sont capables de réguler l'expression de gènes de cellules-hôtes. A titre d'exemple, certains eucaryotes subissent des modifications d'expression protéique lorsqu'ils sont en présence d'AHLs bactériennes. Par exemple, la 3-oxo-C₁₂-HSL de *P. aeruginosa* stimule la réponse inflammatoire des cellules hôtes (Smith et al., 2002), (Telford et al., 1998) (figure 9) ou peut avoir une activité vasodilatatrice (Lawrence et al., 1999). De même, certaines plantes sécrètent des composés semblables aux signaux du QS, en réponse aux AHLs, afin de brouiller ce système de communication utilisé par les bactéries environnantes. Cette perturbation peut être bénéfique pour l'interaction hôte-procaryote en cas de relation symbiotique ou disruptive en cas de relation pathogène (Mathesius et al., 2003). L'élément déclencheur d'un tel comportement n'est autre que la détection de la présence d'AHLs. Pour illustrer ceci, une analyse protéomique montre que la plante *Medicago truncatula* est capable de détecter des concentrations nanomolaires d'AHLs de *Sinorhizobium meliloti* (avec qui la plante établit des relations symbiotiques) et de *P. aeruginosa* (avec qui elle établit des relations pathogènes) (Mathesius et al., 2003). Lorsque *M. truncatula* détecte l'un de ces deux types d'AHLs, elle déclenche des modifications de plus de 6% de son protéome. La plupart des protéines touchées interviennent dans des réponses de stress (Mathesius et al., 2003).

Réciproquement, plutôt que de se faire influencer par les AHLs, certaines cellules eucaryotes produisent des signaux interférant avec le système de QS bactérien. Ceci permet aux eucaryotes d'induire un comportement bactérien favorable ou d'annuler une activité bactérienne indésirable. Ces stratégies d'interférence seront détaillées dans le paragraphe 2.3.

De plus, il existerait une communication spécifique entre bactéries et cellules eucaryotes, médiée par une molécule actuellement non identifiée, mais baptisée AI-3 (Sperandio et al., 2003). Une communication entre de tels individus peut sembler curieuse, mais elle n'est pas surprenante. En effet, de nombreuses bactéries établissent des relations symbiotiques ou pathogènes avec des hôtes eucaryotes. Pour se faire, la bactérie doit interagir avec son hôte, ce qui implique que l'hôte eucaryote puisse percevoir la présence des bactéries et vice-versa (Bauer et al, 2005).

2.2.4 Bactéries polyglottes

Une cinquantaine de bactéries possèdent des homologues de *luxS*, produisent et détectent l'AI-2 (Federle et al., 2003). Parmi ces bactéries, certaines synthétisent et détectent une ou plusieurs AI-1, ce qui leur permet à tout moment d'estimer la proportion de leur espèce au sein de la population globale. Actuellement, on tente de comprendre comment les bactéries perçoivent, intègrent et répondent à l'AI-2, mais aussi comment elles gèrent la présence de plusieurs signaux différents qui coexistent parfois simultanément. Une étude à ce sujet a débuté chez *V. harveyi*; elle tente d'identifier le mécanisme moléculaire gouvernant la détection et la réponse à ces combinaisons de signaux (figure 10). Chez *V. harveyi*, quatre situations sont possibles : pas de phéromone, ou présence d'AI-1, d'AI-2 ou d'AI-1 et d'AI-2 (Mok et al., 2003). Selon la quantité perçue de chacun de ces signaux, la bactérie sait si elle constitue la majorité ou la minorité de la population totale. Pour distinguer les quatre situations possibles, cette bactérie possède un système de détection à deux composants : LuxN perçoit la concentration en AI-1 tandis que LuxP perçoit celle des AI-2. Ces deux senseurs sont normalement des kinases mais deviennent des phosphatases en présence de leurs AI respectifs. Toutes deux convergent vers une voie de signalisation unique composée de LuxU et de LuxO

(figure 10). Lorsque l'AI n'est pas présent, les domaines histidines kinases de LuxN et/ou LuxP phosphorylent LuxU, qui transmet son phosphate à LuxO. LuxO phosphorylée (dite LuxO-P) induit la transcription d'un répresseur qui empêche la transcription des gènes cibles du QS. Donc, lorsque les deux AI sont présents dans le milieu, LuxO est complètement déphosphorylé, ce qui conduit à la production de bioluminescence (figure 10). Par contre, lorsqu'une sorte d'AI ou aucune AI n'est présente, LuxO est partiellement ou totalement phosphorylé, ce qui conduit à l'inhibition de la transcription des gènes cibles. Le système de détection fonctionne donc comme un détecteur qui discrimine la présence des deux AI par rapport aux trois autres situations (AI-1, AI-2, ou pas de phéromones) pour produire une réponse adaptée (Mok et al., 2003).

2.3 Stratégies d'interférence

Certains eucaryotes et procaryotes déploient des stratégies d'interférence afin de perturber les systèmes de communication bactériens. Dans une niche où une espèce bactérienne entre en compétition avec d'autres espèces pour les ressources alimentaires et énergétiques, le pouvoir d'interférer avec les systèmes de QS des bactéries ennemies procure un avantage certain. Chez les eucaryotes, l'interférence permet de lutter contre l'infection de bactéries pathogènes en perturbant l'expression de leurs facteurs de virulence. Les stratégies d'interférence sont multiples :

- L'algue *Delisea pulchra* produit des furanones structuellement similaires aux AHLs produites par *Serratia liquefaciens*, bactérie pathogène de cette algue (Givskov et al, 1996) (figure 11). Ces furanones se lient spécifiquement aux récepteurs de ces AHLs et augmentent leur taux de dégradation protéolytique (Manefield et al., 2002) .
- Certaines bactéries produisent des enzymes capables de dégrader spécifiquement les AHLs. Ceci leur permet de perturber les comportements établis par le QS (figure 12). Deux enzymes existent : l'AHL lactonase (AiiA) et la AHL acylase (AiiD). L'AiiA est produite par certaines espèces *Bacillus*. Cette enzyme hydrolyse l'anneau lactone des AHLs, ce qui rend les phéromones inactives (Dong et al., 2000). L'AiiD est produite par les espèces *Ralstonia*, elle clive la chaîne acyle de l'anneau HSL, ce qui conduit à l'inactivation de l'AHL (figure 13).
- Des hôtes eucaryotes comme *Pisum sativum* peuvent perturber le système de QS en produisant des homologues d'AHLs. Cela leur offre une protection vis-à-vis des pathogènes en modifiant le comportement de ces bactéries (figure 14) (Zhang, 2003).
- *Variovorax paradoxus* utilise les AHLs comme source d'énergie et d'azote, ce qui perturbe le système de QS des bactéries de son environnement (Leadbetter et al., 2000).
- Un autre mode d'interférence est de produire des AHLs capables de se fixer sur les régulateurs transcriptionnels du QS des autres bactéries. L'activation du régulateur est donc modifiée.
- Certaines bactéries comme *Salmonella typhimurium* et *E. coli* sont capables d'importer de l'AI-2 extracellulaire, ce qui élimine le signal de l'environnement. Ce processus nécessite le transporteur ABC encodé par l'opéron *lsr*. Ceci serait un mécanisme qu'*E.coli* et *S.typhimurium* utilisent pour bluffer les autres espèces de manière à ce qu'elles se comportent comme si elles étaient en faible densité de population ou en environnement monoespèce.

Beaucoup de systèmes de QS régulent l'apparition de phénotypes indésirables chez l'homme (comme l'expression des facteurs de virulence, la formation de biofilms, etc.). C'est pourquoi,

tous moyens perturbant ces voies de régulation seraient une opportunité de thérapie antimicrobienne. Depuis peu, la science s'inspire donc des stratégies d'interférence bactériennes pour tenter de lutter contre les bactéries en contrôlant leur communication. Cette nouvelle thérapie a pour but l'inhibition de la synthèse des AHLs ou encore le contrôle de l'activation des régulateurs transcriptionnels de type LuxR (via des furanones ou des AHL synthétiques). De plus, depuis la caractérisation de l'AI-2, un espoir de synthétiser des agonistes ou des antagonistes pouvant perturber la communication inter espèces est né.

2.4 Exemples concrets illustrant l'intérêt des langages bactériens

2.4.1 Le Quorum Sensing dans les relations symbiotiques illustré par *Sinorhizobium meliloti*

S. meliloti est une bactérie du sol capable de fixer l'azote lorsqu'elle s'associe symbiotiquement avec la luzerne *Medicago sativa* (Gonzalez et al., 1996). Les sols sont fréquemment pauvres en nutriments et constituent un environnement peu stable, ce qui est néfaste pour la croissance des bactéries. La rhizosphère (surface des racines et région environnante) constitue donc une niche écologique dans le sol, puisque les nutriments y sont plus disponibles et que les racines libèrent de la matière organique. Beaucoup de bactéries sont attirées par cette rhizosphère et entrent en compétition pour coloniser cette oasis (Davey et al., 2000). La capacité de *S. meliloti* à interagir symbiotiquement avec *M. sativa* lui confère un avantage certain sur les autres bactéries : les *S. meliloti* forment ainsi des communautés structurées semblables à un biofilm attachées aux racines (Davey et al., 2000). Pour établir cette symbiose, les deux partenaires doivent échanger des molécules signal : les racines de *M. sativa* sécrètent des flavonoïdes, qui stimulent l'expression des gènes *nod* chez *S. meliloti*. L'expression de ces gènes s'ensuit et leurs produits sont synthétisés : il s'agit des lipochitoooligosaccharides (plus communément appelés facteurs Nod) (Gonzalez et al., 1996) (Gonzalez et al., 2003). En sécrétant ces facteurs Nod, les bactéries induisent la formation de nodules, à la surface des racines, qu'elles sont capables de pénétrer (figure 15). Cette étape implique la production d'exopolysaccharides par les bactéries. Dans les nodules, les bactéries se différencient en une forme capable de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéries assurent donc une source d'azote aux plantes qui à leur tour fournissent une niche propice au développement des *Sinorhizobium*. Le QS régule et coordonne plusieurs de ces étapes permettant aux bactéries d'interagir avec son hôte (Marketon et al., 2002) (Gonzalez et al., 2003).

2.4.2 Rôle du quorum sensing dans la virulence

Le QS permet de réguler l'expression de nombreuses fonctions comme la formation de biofilms, la synthèse d'antibiotiques et l'expression d'autres facteurs de virulence. Sans ceux-ci, l'établissement d'une relation pathogène serait impossible.

2.4.2.1 *Erwinia carotovora*

Cette bactérie est un pathogène des pommes de terre, induisant la pourriture molle bactérienne ou « soft-rot ». Pour réaliser cela, elle sécrète une cellulase et plusieurs pectinases qui macèrent les parois cellulaires de la plante hôte. Un système de QS de type LuxI/LuxR (ExpI/ExpR) permet l'induction des gènes impliqués dans la sécrétion de ces exoenzymes lorsque les bactéries atteignent le quorum. Ce contrôle de la sécrétion des exoenzymes par le QS permet aux bactéries de ne pas blesser leur hôte prématurément et donc de ne pas alerter celui-ci de leur présence avant d'avoir atteint un nombre d'individus suffisant pour l'infection.

Un deuxième système de QS existe : CarI/CarR. Il régule la biosynthèse de l'antibiotique carbapénème en réponse à la densité de population cellulaire et de l'AHL.

Chez *E. carotovora*, la production d'exoenzymes et d'antibiotiques a lieu simultanément. Les exoenzymes endommagent la paroi cellulaire, les antibiotiques servent à éliminer les

bactéries étrangères qui profiteraient de la dégradation de la paroi cellulaire pour infecter la plante.

2.4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, pathogène opportuniste chez l'homme. Elle est responsable de graves infections nosocomiales et notamment d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Van Delden et al., 1998). La virulence de cette bactérie dépend de nombreux facteurs dont l'expression est régulée, pour la plupart, par le QS. Les gènes cibles du système de QS de *P. aeruginosa* codent entre autres pour des enzymes (élastase, alcaline phosphatase, protéase...) et des exotoxines (exotoxine A...) néfastes pour les tissus de l'homme. Ces facteurs de virulence ne sont exprimés que lorsque les bactéries sont en grand nombre. A ce moment là, elles peuvent produire leurs exotoxines sans craindre les défenses immunitaires de l'hôte.

Des analyses microscopiques d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose ont montré que *P. aeruginosa* était présente sous forme de biofilms *in vivo*. Ce phénotype est également régulé par ses deux systèmes de QS LasI/LasR et RhII/RhlR et permet de protéger la bactérie contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte infecté. Chaque système de QS intervient à un stade différent de maturation du biofilm (Sauer et al., 2002).

3. Les biofilms

Les organismes procaryotes peuvent coloniser de nombreuses niches, même celles qui sont inhospitalières pour la majorité des formes de vie supérieures. Les bactéries parviennent à survivre dans ces habitats grâce à leurs facultés adaptatives face aux changements environnementaux. Dans la recherche d'une niche favorable, les mécanismes de nage orientée sont un atout majeur, puisqu'ils dirigent les bactéries vers la niche où elles sont capables de se propager. Tout comme la mobilité flagellaire, l'agrégation et la formation de biofilm sont des stratégies très utilisées : l'agrégation augmente les interactions bactérie – bactérie, ce qui leur permet de former une communauté et de tirer un avantage des phénotypes de leurs voisins. Une grande majorité des micro-organismes unicellulaires (procaryotes ou eucaryotes) alternent donc entre la vie planctonique individuelle et un style de vie proche de la multicellularité dans lequel ils fonctionnent comme une part intégrante d'une population ou d'une communauté appelés biofilms (illustration dans la figure 16).

3.1 Définition

Les biofilms sont des structures englobant une communauté bactérienne, leur permettant de vivre en équilibre avec leur environnement et de s'organiser pour exploiter toutes les ressources disponibles. Dans le cas de bactéries pathogènes, ils offrent une protection aux micro-organismes face au système immunitaire de l'hôte infecté ou aux substances bactéricides comme les antibiotiques (Sutherland, 2001). La formation et le maintien des biofilms dépend de la production d'une matrice extracellulaire polymérique qui est entièrement synthétisée et colonisée par des micro-organismes (Winans et al., 2002) (Sutherland, 2001). Ces individus constituent une espèce unique ou des espèces différentes ; on parle alors de biofilm mixte (Winans et al., 2002). Les matrices extracellulaires sont très diverses et contribuent fortement à l'organisation de la communauté. De nombreux micro-environnements existent au sein des biofilms : par exemple, l'arrangement spatial des bactéries donne lieu à des gradients de concentration en nutriments, pH, mais aussi en oxygène et autres accepteurs d'électrons. Des habitats aérobies et anaérobies naissent ainsi en proximité étroite, ce qui contribue à créer des biofilms mixtes (Wimpenny et al., 2000). Lorsqu'on observe cette matrice en microscopie, on remarque qu'elle est traversée par des canaux aqueux permettant de transporter des nutriments jusqu'aux bactéries enfouies dans cette matrice et d'évacuer les déchets métaboliques de ces micro-organismes.

3.2 Formation des biofilms

La formation de tout biofilm comporte trois étapes : tout d'abord l'attachement des bactéries à une surface biotique ou abiotique, ensuite la maturation du biofilm et enfin la dislocation ou la dispersion des bactéries du biofilm qui reprennent alors un mode de vie planctonique (figure 17). Bien que certains eucaryotes comme *Candida albicans* soient capables de former des biofilms (Kumamoto, 2004), la suite de cette introduction ne se focalisera que sur les biofilms bactériens. Le processus de formation des biofilms se complexifie lorsqu'il s'agit de biofilms mixtes, puisqu'il s'agit d'assemblages complexes composés de multiples espèces et de nombreux polymères matriciels différents.

3.2.1 Attachement

Durant cette étape, la bactérie interagit avec une surface via une ou plusieurs de ses structures de surface (pili, flagelle, LPS, adhésines...). Si la bactérie vainc la force du flux du milieu, elle peut former une monocouche avec ses congénères et poursuivre, ensemble, la formation du biofilm (Davey et al., 2000).

Le processus de formation des biofilms est déclenché lorsque les bactéries détectent des changements environnementaux favorisant la transition de la croissance planctonique vers la vie sur une surface. Les paramètres environnementaux qui contrôlent cette transition varient suivant les micro-organismes. Il peut s'agir du pH, de l'osmolarité, de la disponibilité en fer, de la tension en oxygène ou de la température. Chez *P. aeruginosa*, par exemple, c'est un environnement pauvre en eau et riche en ions K^+ , Na^+ , HCO_3^- , et Cl^- dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose qui est propice au développement de biofilms (Wingender et al, 1999).

L'attachement est conditionné par la nature de la surface et par les molécules de surface des bactéries (Parsek et al., 2005). Ainsi, le pathogène *Vibrio cholerae* utilise deux pili de type IV différents selon la surface à laquelle il doit adhérer (O'Toole et al., 2000) (figure 18). Pour coloniser les surfaces biotiques telles que l'intestin de son hôte, la bactérie *V. cholerae* utilise un premier pilus de type IV (toxin-coregulated-pilus). Par contre, pour s'attacher aux surfaces abiotiques qu'elle exploite lorsqu'elle n'est pas dans l'intestin humain hôte, elle se sert d'un second pilus de type IV (mannose-sensitive hemagglutinin) encodé par le locus *msh*.

3.2.2 Maturation

Lorsque la monocouche de bactéries est formée, la formation du biofilm se poursuit : chaque bactérie produit de la matrice extracellulaire. Certaines espèces bactériennes modifient parfois leurs structures de surface pour permettre aux autres bactéries de s'attacher et d'agrandir le biofilm en formant des microcolonies. *P. aeruginosa*, par exemple, raccourcit son LPS de manière à ce que ses adhésines puissent entrer en contact avec d'autres individus et agrandir le biofilm (Wingender et al, 1999). Au fur et à mesure que la matrice est produite, de nouvelles bactéries viennent s'agréger et des microcolonies se forment (Wingender et al, 1999) (O'Toole et al., 2000). De plus, lors de la maturation, les bactéries se différencient de manière à se partager les tâches fonctionnelles au sein du biofilm, ce qui les rend capables d'exister unicellulairement tout en résidant dans des communautés multicellulaires (Costerton et al., 1999). Ce comportement collectif peut impliquer plus d'une espèce de bactérie.

3.2.3 Dislocation

Le processus de maturation s'arrête lorsqu'une perturbation environnementale survient. Il peut s'agir d'un stress tel qu'une carence, une variation de pH ou encore une hypoxie rendant la vie en biofilm défavorable. Un milieu qui stagne conduit aussi à la dislocation des biofilms : des produits métaboliques comme le CO_2 et les acides organiques peuvent s'accumuler et conduire à une variation du pH local. Ceci est un stimulus pour déclencher le processus de dislocation (Wingender et al, 1999). De plus, de nombreuses bactéries communiquent chimiquement par QS

dans les biofilms, ce qui leur permet entre autres de s'influencer au niveau de la densité cellulaire. Or, une densité importante de la population constitue un autre signal initiant la dislocation du biofilm (Wingender et al, 1999).

Dans de telles situations défavorables, les bactéries régulent l'expression de leurs gènes pour stopper la production de matrice et cesser l'agrandissement du biofilm. Parfois, le biofilm peut même se désagréger : lorsqu'elle perçoit un stress, *P. aeruginosa* libère des alginate lyases dans le milieu externe, enzymes dégradant le composant principal de sa matrice extracellulaire (l'exopolysaccharide alginate). C'est l'étape de dispersion où les bactéries quittent le biofilm en nageant activement pour revivre en mode planctonique et coloniser de nouvelles niches (Davey et al., 2000).

3.3 Fonctions des biofilms

La matrice des biofilms offre plusieurs avantages aux bactéries qui y vivent.

- La matrice est responsable de l'intégrité du biofilm puisqu'elle en constitue la charpente. Ceci permet de garder les bactéries ensemble et de les protéger des influences indésirables de l'environnement extérieur. De plus, la matrice intervient dans l'association des bactéries en les aidant à adhérer et en facilitant les interactions entre les bactéries et l'environnement. L'architecture du biofilm crée une organisation spatiale dans le biofilm et des niches sont formées au sein de ces systèmes organisés spatialement. En effet, les bactéries sont exposées à des gammes de signaux environnementaux différents au sein d'un même biofilm, voire d'une même microcolonie (Whiteley et al., 2001). Ceci est propice à l'établissement de biofilms mixtes composés de bactéries ayant des niches différentes et permet alors la coopération métabolique entre espèces différentes (Davey et al., 2000). Cette coopérativité est souvent utile pour accomplir des processus irréalisables par des populations d'une seule espèce. Grâce à ces interdépendances, les bactéries contribuent individuellement au maintien de la population et donc à leur propre survie. Par exemple, la dégradation de la matière organique complexe en méthane et dioxyde de carbone lors de la digestion anaérobie nécessite l'interaction de trois groupes bactériens (voir figure 19). Les biofilms fournissent un environnement idéal pour établir ce type de relation syntrophique (symbiose où différentes espèces bactériennes métaboliquement distinctes dépendent l'une de l'autre pour utiliser certains substrats et produire de l'énergie).
- La matrice a de nombreux rôles protecteurs : dans le cas d'un biofilm dans une relation hôte-pathogène, la matrice protège les bactéries du système immunitaire de l'hôte en leur fournissant une cachette (Sutherland, 2001) (figure 20). La matrice leur offre d'autres avantages protecteurs, partagés par les bactéries non pathogènes : elle protège les micro-organismes qu'elle héberge contre les bactéricides (antibiotiques, désinfectants...) en interagissant avec eux (simple interaction chimique avec les polymères matriciels ou présence d'enzymes inactivatrices comme les β -lactamases de *P. aeruginosa*) ou en limitant simplement leur diffusion en faisant office de barrière (O'Toole et al., 2000) (Shirtliff et al., 2002). En effet, en englobant des microcolonies, la matrice crée des micro-environnements dans lesquels les fluctuations sont moins fortes que dans le milieu externe. Les bactéries sont donc protégées contre les stress environnementaux de type radiations UV, variations de pH ou encore le choc osmotique. Les canaux hydratés ralentissent les risques de dessiccation des bactéries, ce qui leur laisse éventuellement le temps de s'ajuster métaboliquement pour survivre à la déshydratation.
- La matrice a un rôle nutritif pour les bactéries. Les canaux hydratés dispersés dans tout le biofilm permettent l'échange entre les nutriments provenant de l'environnement externe et les métabolites largués par les microcolonies. Ceci améliore donc la disponibilité des nutriments et évite l'accumulation de composés potentiellement toxiques (Costerton et

al., 1994). En cas de carence, beaucoup de bactéries se mettent à produire des exopolysaccharides car ils sont capables d'emprisonner de nombreux ions et d'adsorber les composés organiques dissous dans l'environnement (Shirtliff et al., 2002). Néanmoins, en cas de famine, la matrice peut constituer par elle-même une réserve de nutriments consommables par les bactéries du biofilm. D'ailleurs, certaines bactéries produisent des enzymes capables de dépolymériser la matrice pour s'en nourrir.

Enfin, l'environnement confiné qu'offrent les biofilms est propice au transfert horizontal de gènes, nécessaire pour l'évolution et la diversité génétique des micro-organismes (Davey et al., 2000) (Donlan, 2002). Les bactéries s'échangent du matériel génétique, au sein d'une population ou entre populations différentes, par transformation, conjugaison ou transduction.

Les biofilms ont aussi des fonctions dans le macro-environnement qui les entourent. Par exemple, les bactéries du sol profitant des richesses de la rhizosphère produisent des polymères matriciels qui augmentent l'agrégation du sol, ce qui améliore la disponibilité de l'eau et confère un avantage pour la plante (Davey et al., 2000). Il s'agit donc dans ce cas d'une véritable relation symbiotique.

3.4 Composition de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est une structure gélatineuse tridimensionnelle englobant les bactéries au sein des biofilms. La matrice constitue 50 à 90% de la matière totale des biofilms (Nielsen et al., 1997). Elle est responsable de l'intégrité structurale et fonctionnelle des biofilms dont elle détermine les propriétés physico-chimiques (Branda et al., 2005). La structure de la matrice dépend de la nature des biopolymères qui la constituent : il s'agit de macromolécules pouvant être arrangées en unités répétées : des protéines, des lipides, des acides nucléiques et surtout des polysaccharides (tableau 2).

La matrice est également composée de substances non polymérisables tels que des nutriments absorbés, de l'eau (circulant dans les nombreux canaux parcourant les biofilms), des métabolites, des produits de lyse cellulaire et des particules ou débris de l'environnement extérieur. Les proportions de tous ces composés varient constamment, c'est pourquoi la matrice est très hétérogène.

La matrice synthétisée par les bactéries étant extracellulaire, un système d'exportation est nécessaire pour exporter ces constituants matriciels en surface des cellules ou dans l'environnement après leur synthèse. Plusieurs modes d'exportation existent : certains polysaccharides et protéines sont sécrétés activement dans le milieu extracellulaire par des machineries d'exportation situées en membrane, d'autres sont des composés intra-cellulaires (acides nucléiques, enzymes) ou membranaires (LPS, phospholipides) libérés spontanément sous forme de vésicules (ou blebs) formées à partir des membranes des micro-organismes. Certains composés intra-cellulaires de haut poids moléculaire comme le glycogène peuvent être émis dans l'environnement extracellulaire par lyse de la cellule. Les produits du turnover métabolique des cellules sont donc déversés dans la matrice pour être recyclés : rien ne se perd !

3.4.1 Polysaccharides

Il existe trois types de polysaccharides : les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) (D'Haeze et al., 2004).

Les chercheurs ont longuement essayé de trouver des EPS spécifiques des biofilms et communs à toutes les bactéries, en vain. Les EPS sont d'une telle complexité et d'une telle variabilité que l'on pense aujourd'hui que chaque bactérie synthétise un EPS qui lui est spécifique, pouvant même être différent selon les conditions environnementales dans lesquelles elle se trouve. Pour s'accrocher à un biofilm, les bactéries planctoniques produisent un ou plusieurs EPS. Quelques EPS sont de simples homopolysaccharides contenant un seul type de sucre, comme le mutan de *Streptococcus mutans* ou le curdlan d'*Agrobacterium radiobacter*

composés de glucans liés en α -1-3. D'autres sont des polymères plus complexes composés d'unités hexa-, hepta- ou octasaccharidiques répétées contenant chacune trois à cinq monosaccharides différents. En guise d'illustration, l'acide colanique d'*E. coli*, de *S. typhimurium* et d'*Enterobacter cloacae* se compose de répétitions d'un hexasaccharide à base de glucose, de fucose, de galactose et de pyruvate. De plus, chaque sucre peut se voir substitué par des groupements tels que l'acyl, l'acetyl, le pyruvyl ou encore le succinyl. Lorsqu'on enlève ces résidus, on altère les propriétés physiques de la structure du biofilm (Ridout et al., 1997).

La composition en EPS des biofilms est dynamique et varie en fonction de l'âge du biofilm, de la présence de plusieurs espèces et des stress environnementaux.

Chaque polymère polysaccharidique a sa propre structure et composition qui déterminent la conformation secondaire ordonnée du polymère. Il s'agit le plus souvent d'hélices qui ont la possibilité de s'agréger. Par exemple, les galactoglucans sont des EPS synthétisés par de nombreuses bactéries comme *Rhizobium ssp* ; ils forment une double hélice dans laquelle les substituants acétyl et pyruvyl sont localisés en périphérie, ce qui permet à ces groupements d'interagir avec d'autres molécules ou des cations. Dans certains systèmes, aucune conformation ordonnée n'a été démontrée.

Les polysaccharides de la matrice forment un gel dont la flexibilité dépend du type de liaison qui unit les monosaccharides. Lorsque le squelette du gel est composé de liens β -1,3 ou β -1,4, les polymères tendent à être plus rigides. C'est le cas de la cellulose ou du xanthan synthétisé par *Xanthomonas campestris*. Inversement, lorsque les polymères sont reliés par des liens α -1,2 ou α -1,6, ils forment un gel plus flexible.

Bien que constituée essentiellement de polysaccharides, la matrice des biofilms se compose aussi de protéines et d'ADN.

3.4.2 Protéines

Outre leur interaction avec les polysaccharides matriciels, les protéines dans les biofilms sont principalement des enzymes de dégradation qui fournissent des nutriments, pouvant être importés et métabolisés par les bactéries, à partir des macromolécules présentes dans le micro-environnement. Parfois, les protéines ont des rôles de saccharidases ou de lyases, provoquant la désagrégation, la perte et la dispersion des bactéries dans le milieu environnant (Boyd et al, 1994 ; Xun et al, 1990).

3.4.3 Acides nucléiques et mort cellulaire

La matrice comprend bien souvent de l'ADN, qui aide les bactéries à adhérer à la matrice, mais sa source est controversée. En effet, certains chercheurs pensent que cet ADN provient de bactéries lysées tandis que d'autres spéculent que certaines bactéries comme *P. aeruginosa* sont capables de produire de l'ADN extracellulaire via un mécanisme indépendant de la lyse bactérienne, mais qui semble impliquer la libération de petites vésicules depuis la membrane externe (Whitchurch et al., 2002).

A l'image des organismes multicellulaires ou des bactéries à caractère multicellulaire comme *Myxococcus xanthus* qui induit la lyse d'une sous population de bactéries pour pouvoir développer ses fruiting bodies, les bactéries au sein des biofilms ont un mécanisme de mort cellulaire programmée (Webb et al., 2003). En effet, la mort d'une sous population de bactéries a été observée dans des microcolonies de biofilms (figure 21). L'autolyse peut sembler indésirable pour un organisme unicellulaire, mais elle est bénéfique pour une population bactérienne à un niveau multicellulaire : les bactéries vivantes profitent des débris cellulaires pour continuer leur différenciation (Webb et al., 2003).

3.4.4 Agents stabilisants et altérateurs de la matrice

Toute bactérie doit réagir le plus rapidement possible face à n'importe quel stress qui la menace. Néanmoins, dans un biofilm, le stress n'est pas fréquent parce que cet habitat offre aux bactéries un environnement confiné, tamponnant ce qu'il se passe à l'extérieur et assurant une

réserve de nutriments. Cependant, de nombreuses substances viennent constamment altérer la matrice, ce qui finit par la désorganiser, la détruire et stresser les bactéries (Sutherland, 2001). Ces agents altérateurs sont de tout genre :

- ❖ Une forte concentration de nutriments favorise la formation de biofilms denses. Inversement, une accumulation de composés toxiques endommage les bactéries et contribue donc à la formation de biofilms moins denses.
- ❖ Les bactéries vivant dans les biofilms sont proches les unes des autres et compètent pour les ressources nutritionnelles disponibles. La capacité éventuelle d'une espèce bactérienne à synthétiser des agents antimicrobiens (comme les antibiotiques, les bactériocines,...) lui confère un avantage certain, puisque ces agents lui permettent d'éliminer les micro-organismes concurrents sensibles à la drogue (Sutherland, 2001).
- ❖ Certaines bactéries peuvent sécréter des surfactants (Al-Tahhan et al., 2000). Leurs actions sont diverses : par exemple, le surfactant de *P. aeruginosa* rend les surfaces plus hydrophobes et provoque la perte du LPS des bactéries à Gram négatif, afin que ces dernières n'adhèrent pas à leur biofilm. Cette substance permet aussi aux bactéries de solubiliser et d'utiliser des substrats préalablement inaccessibles. Les surfactants peuvent aussi altérer l'attachement du biofilm à sa surface en interagissant avec les régions hydrophiles exposées à la surface.
- ❖ Quelques bactéries ont la possibilité de synthétiser des enzymes de type polysaccharidases dégradant les EPS de la matrice. Ces enzymes ont des effets délétères, puisqu'elles grignotent les charpentes du biofilm. Elles modifient la plasticité de la matrice en solution aqueuse soit en renforçant quelques portions du biofilm via la formation de gels, soit en jouant sur la coopération des polymères lorsqu'ils s'ordonnent pour former des hélices structurées (Sutherland, 2001).
- ❖ Des muramidases dégradent le peptidoglycan des bactéries, ce qui conduit à leur lyse (Sutherland, 2001). Il en résulte la libération de nutriments, exploitables par les autres bactéries pour leur croissance et la dispersion des constituants de la cellule lysée (ADN, polymères...).

3.5 Biofilms et Quorum Sensing

Le biofilm permet le rassemblement de plusieurs bactéries de même espèce ou non dans un environnement confiné. Certaines de ces bactéries, qu'elles soient libres ou agrégées, communiquent chimiquement par le biais de phéromones. Les microcolonies des biofilms constituent des zones fort peuplées, ce qui a pour conséquence la concentration locale de molécules dont éventuellement des phéromones. De plus, les phéromones diffusent mal dans l'environnement matriciel, ce qui engendre leur accumulation dans la matrice. Le quorum est donc souvent atteint et les bactéries peuvent ainsi maintenir un phénotype régulé par le QS comme la production d'un EPS (Parsek et al., 2005). Les AHLs permettraient aux bactéries de se différencier vers un phénotype attaché via l'expression de polymères adhérents. Ces phéromones faciliteraient aussi l'induction d'autres gènes essentiels pour pouvoir maintenir la croissance du biofilm. Pour illustrer la corrélation qui existe parfois entre le QS et les biofilms, je décrirais le cas de *Sinorhizobium meliloti*.

Pour envahir les nodules racinaires dont elle a induit la formation dans la plante symbiotique, la bactérie doit impérativement produire un exopolysaccharide de faible poids moléculaire, qu'il s'agisse de succinoglycan ou de galactoglucan. La forme de haut poids moléculaire ne permet pas la pénétration des bactéries dans les nodules. Le succinoglycan est un polymère d'un octasaccharide substitué tandis que le galactoglucan est une répétition d'une unité dissaccharidique substituée (figure 22). Le succinoglycan est dit de faible poids moléculaire

lorsque l'octasaccharide est polymérisé moins de quatre fois. Par contre, le dissaccharide doit être répété quinze à vingt fois pour être un galactoglucan de faible poids moléculaire. Les gènes responsables de la biosynthèse du succinoglycan appartiennent à un cluster de gènes de 25 kb (les gènes *exo*) tandis que le galactoglucan est encodé par le cluster de gènes *exp* (32 kb). Ces deux clusters de gènes se situent sur un des deux mégaplasmides *Sym*.

La régulation de la synthèse de ces exopolysaccharides est très complexe. Pour réguler la production du galactoglucan, une copie fonctionnelle d'ExpR est nécessaire. Il s'agit d'un régulateur transcriptionnel du QS, dépend d'un régulateur transcriptionnel du QS, ExpR. Ce régulateur particulier, puisqu'il n'agit pas en tandem avec une synthétase qui lui est propre. Par contre, ExpR est capable de répondre aux AHLs produites par la synthétase du système SinI/SinR, l'un des trois systèmes de QS identifié chez *S. meliloti* (Marketon et al., 2003). Dans ce système, SinI est une synthétase produisant plusieurs AHLs. Bien que celles-ci soient toutes capables de se lier au régulateur SinR, certaines de ces AHLs sont capables de se lier à ExpR. En présence de ces AHLs, ExpR se fixe aux promoteurs des gènes du cluster *exp*, rassemblant les gènes responsables de la biosynthèse du galactoglucan.

En plus d'activer l'opéron *exp* et donc la biosynthèse du galactoglucan, il semblerait que le système régule la production de succinoglycan de faible poids moléculaire (Hoang et al., 2004). En effet, ce système de QS pourrait réguler la synthèse d'endoglycanases, enzymes responsables du clivage du succinoglycan de haut poids moléculaire en succinoglycan de faible poids moléculaire (Hoang et al., 2004).

De plus, des signaux environnementaux tels que la concentration en phosphate régulent aussi la production des exopolysaccharides de *S. meliloti* (Mendrygal et al., 2000). En faible concentration de phosphate (dans le sol), du galactoglucan de haut poids moléculaire est formé. Quand les bactéries atteignent la rhizosphère, où la concentration en phosphate et la densité de population sont plus importantes, la production de galactoglucan est bloquée, mais la synthèse de succinoglycan de faible poids moléculaire est induite, ce qui contribue à la pénétration des bactéries dans les nodules (Marketon et al., 2003).

De multiples autres corrélations entre le QS et les biofilms ont été observées chez d'autres bactéries. En voici quelques exemples :

- ◆ Parce que les *P. aeruginosa* vivent en biofilm dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose, ces bactéries résistent à l'attaque des phagocytes, du complément, mais aussi aux antibiotiques. Ceci laisse, jusqu'à ce jour, ces patients sans traitement efficace. Des études récentes lient le QS à la maturation des biofilms de *P. aeruginosa*. Le mécanisme exact n'est pas encore élucidé, mais quelques données sont disponibles : lorsqu'on perturbe le système LasI/LasR, *P. aeruginosa* initie normalement la formation de son biofilm, mais ne parvient pas à maturer. Il en résulte un biofilm anormal, flasque, qui ne résiste pas au détergent SDS (Davies et al., 1998). L'addition de la 3-oxo-C₁₂ HSL dans le milieu de culture restaure la formation d'un biofilm normal, différencié et résistant au SDS (Davies et al., 1998). De même, un facteur sigma de la RNA polymérase est impliqué dans la formation des biofilms en régulant le système *rhl* (Kuchma et al., 2005). Il s'agit de RpoN, impliqué dans l'expression de plusieurs gènes dont ceux permettant la synthèse des pili et du flagelle, appendices nécessaires dans l'étape d'initiation du biofilm de *P. aeruginosa*.
- ◆ Un système de QS hiérarchisé dépendant de la température et utilisant au moins trois AHLs régule la formation d'agrégats et la motilité des bactéries *Yersinia pseudotuberculosis* en jouant sur l'expression du flagelle (Atkinson et al., 1999).

- ◆ Chez *Vibrio cholerae*, le QS stimule la production de facteurs de virulence et/ou la formation de biofilms aux faibles densités de population, en régulant les gènes impliqués dans la synthèse des EPS (Hammer et al., 2003).
- ◆ Chez *Pantoea stewartii*, le système de QS EsaI/EsaR régule la synthèse du CPS stewartan, véritable facteur de virulence indispensable pour infecter le maïs (Von Bodman et al., 1998)
- ◆ Chez *Rhodobacter sphaeroides*, le système CerI/CerR réprime la production d'un EPS et empêche ainsi la formation d'agrégats bactériens (Puskas et al., 1997).
- ◆ Le QS régule la production de l'EPS de *Thermotoga maritima* (Johnson et al., 2005).

4. Le genre *Brucella* et la brucellose

Brucella melitensis 16M étant le modèle d'étude de ce mémoire, voici la description de cette bactérie pathogène intracellulaire.

4.1 Généralités

Brucella ssp. est un genre bactérien appartenant à la classe des α -protéobactéries, au même titre qu'*Agrobacterium*, *Sinorhizobium* ou *Bartonella* ayant en commun la capacité d'interagir avec les cellules eucaryotes (Moreno et al., 1998). *Brucella* est un pathogène intracellulaire de mammifères qui survit et se réplique à l'intérieur de cellules phagocytaires (professionnelles ou non) de son hôte. Il existe huit espèces de *brucellae*, nommées d'après l'hôte préférentiel qu'elles infectent (voir tableau 3). *B. melitensis* est la plus répandue dans le monde et la plus invasive des *brucellae*, puisque 10 bactéries suffisent pour induire la brucellose chez l'homme.

4.2 Caractéristiques microbiologiques et génétiques

Les *Brucellae* sont des petites bactéries, puisque leur taille varie de 0,6 à 1,5 μm et que leur diamètre est de 0,5 à 0,7 μm (figure 23). Ce sont des bactéries Gram négatives, asporulées, aérobies strictes, non mobiles et non capsulées.

D'un point de vue génétique, le génome de *Brucella* se répartit sur deux chromosomes circulaires. L'un a une taille de 1, 2 Mb tandis que l'autre fait 2, 2 Mb. Cette bactérie ne comporte pas de plasmide (Boschioli et al., 2002) et aucun échange génétique naturel n'a encore été mis en évidence (O'Callaghan & MacMillan, 2001).

4.3 La brucellose

Brucella est responsable d'une zoonose mondiale appelée brucellose (figure 24). Chaque espèce infecte un hôte de prédilection (voir tableau 3), mais *B. suis*, *B. abortus* et *B. melitensis* peuvent également infecter l'homme. La brucellose humaine est aussi appelée « fièvre de Malte », d'après le symptôme principal provoqué par la maladie et en mémoire de l'île de Malte où l'on a isolé pour la première fois l'agent responsable de cette fièvre typiquement ondulante (Boschioli et al., 2002).

L'homme s'infecte en ingérant des aliments d'origine animale contaminés (comme le lait non pasteurisé) ou par simple contact avec des animaux d'élevages infectés ou morts. Dans ce cas, les bactéries entrent en contact avec l'organisme par inhalation d'aérosols infectieux ou par des lésions cutanées. Sans hygiène de vie, la contamination est difficilement évitable. C'est pourquoi, ce sont principalement les pays en voie de développement qui constituent les régions endémiques (Amérique latine, Asie, ...). Lorsque *Brucella* sévit dans ces régions, elle est vite responsable de problèmes de santé humaine importants, mais aussi de difficultés économiques majeures, puisque l'agriculture et l'élevage constituent les ressources principales de ces

populations. Enfin, la brucellose se diagnostique parfois en région moins endémique, surtout chez des personnes exerçant des professions à risque comme les fermiers, les vétérinaires et les chercheurs.

La brucellose provoque l'avortement chez les mammifères femelles gestantes et engendre des problèmes de fertilité chez les mâles. Néanmoins, avant d'en arriver là, des symptômes se manifestent : une fièvre intermittente apparaît éventuellement accompagnée de symptômes plus généraux comme des tremblements, de la dépression, des sueurs nocturnes, des douleurs articulaires, de la fatigue ou encore une perte de poids. Si la maladie devient chronique, des complications articulaires, méningées ou de type endocardites peuvent survenir, selon la localisation de la bactérie.

Il n'existe pas de vaccin contre la brucellose humaine, mais il existe un traitement antibiotique efficace à base de rifampicine et de doxycycline. *Brucella* se classe donc dans les pathogènes de type III.

4.4 Mécanismes d'infection de *Brucella*

Après pénétration dans l'organisme hôte (par inhalation, ingestion ou via une lésion cutanée) les *Brucellae* gagnent les voies lymphatiques, à la recherche de cellules phagocytaires (macrophages) ou de neutrophiles. Les bactéries séjournent une longue période dans les nœuds lymphatiques qui drainent le site de l'inoculation. Lorsque les conditions sont propices à leur expansion, elles se propagent dans le corps via la voie sanguine et infectent d'autres cellules phagocytaires professionnelles (macrophages) ou non professionnelles (trophoblastes). Le pouvoir pathogène de *Brucella* réside dans cette aptitude à survivre et se multiplier dans les cellules phagocytaires professionnelles ou non de son hôte. Ces cellules immunitaires constituent la niche de cette bactérie. La survie intracellulaire permet à *Brucella* d'échapper aux défenses immunitaires extracellulaires de l'hôte, telles que le complément et les anticorps.

La bactérie pénètre dans les cellules hôtes en se laissant phagocyter. Elle se retrouve alors enfermée dans un phagosome qui va fusionner avec un endosome précoce. Il en résulte une vacuole que *Brucella* va dévier afin d'éviter la voie classique de fusion phago-lysosomale qui conduirait à son extermination. La vacuole contenant *Brucella* va ensuite maturer en une vacuole appelée brucellosome (la niche intracellulaire unique dans laquelle elle se multiplie) (Celli et al., 2003) (figure 25).

La manière dont *Brucella* détourne le phagosome est inconnue, mais il a été décrit que cette bactérie exprime un système de sécrétion de type IV qui interviendrait dans au moins un étape du processus (Boschirol et al., 2002). Cet appendice est essentiel à la survie intracellulaire et à la multiplication de *B. suis*, *B. melitensis* et *B. abortus* et se rencontre fréquemment en surface d'autres bactéries pathogènes. Cette machine d'exportation leur sert généralement de seringue pour libérer dans le milieu extérieur de l'ADN ou plus souvent pour injecter des facteurs de virulence indispensables dans le processus d'infection dans l'environnement ou directement dans les cellules hôtes (Boschirol et al., 2002). Dans le cas de *Brucella*, cet appareil de sécrétion est encodé par douze gènes homologues à l'opéron *virB* d'*A. tumefaciens*, mais aucun effecteur sécrété n'a encore été identifié (figure 26). Cet appendice est indispensable pour la maturation des vacuoles en brucellosome (Celli et al., 2003). Chez *B. melitensis*, l'opéron *virB* est exprimé en phase stationnaire et son promoteur est induit en milieu acide et pauvre en nutriments (semblable à celui rencontré dans le phagosome). Ceci laisse penser que l'appareil de sécrétion de type IV est synthétisé immédiatement après internalisation (Boschirol et al., 2002). Cette idée se confirme par l'étude de mutants de gènes *virB*, qui sont incapables de dévier le trafic intracellulaire des cellules hôtes.

4.5 *Le Quorum Sensing chez Brucella melitensis*

Il semblerait que le QS soit le mécanisme choisit par *Brucella* pour réguler finement l'expression de ses facteurs de virulence (dont l'opéron *virB*), ce qui lui permet de mener à bien son cycle infectieux (figure 27).

4.5.1 Les AHLs

En 2002, deux AHLs ont été identifiées dans le surnageant de culture de *B. melitensis* 16M. Ces phéromones furent purifiées, puis caractérisées chimiquement par HPLC et spectrométrie de masse (Taminiau et al., 2002). La première AHL est une C₁₂-HSL ; la seconde ne fut pas purifiée en quantité suffisante pour pouvoir être caractérisée chimiquement, mais d'après un profil TLC, il s'agirait d'une 3-oxo-C₁₂-HSL (Taminiau et al., 2002).

4.5.2 La synthétase

A ce jour, malgré tous les efforts mis en place, aucune synthétase d'AHLs n'a encore été détectée chez *Brucella*. Dans le génome de *Brucella*, aucun gène ne présente d'homologie de séquence avec les familles des synthétases LuxI et LuxM. Par contre, un homologue à HdtS, la nouvelle AHL-synthétase putative, a été identifiée. Les phéromones présentes dans le surnageant de culture de *B. melitensis* pourraient être produites par cette synthétase.

4.5.3 Les régulateurs du QS

Sur base d'homologie de séquence, il a été mis en évidence que *Brucella melitensis* possède deux régulateurs du QS homologues au régulateur LuxR de *V. fischeri*. Il s'agit de VjbR et de BabR.

4.5.4 Les cibles de VjbR et BabR

Actuellement, aucune cible de BabR n'a été mise en évidence. Par contre, il a été montré que VjbR régule la transcription de l'opéron *virB*, qui encode l'appareil de sécrétion de type IV de *Brucella*. En présence de C₁₂-HSL, VjbR réprime la transcription de cet opéron cible. La présence de cette AHL pourrait mimer les conditions de la phase stationnaire, responsables de l'inhibition de la transcription de l'opéron *virB*. D'autres études visant à identifier de nouvelles cibles de VjbR, mais aussi de BabR sont en cours.

OBJECTIF DU MEMOIRE

OBJECTIF DU MEMOIRE

Le Quorum Sensing (QS) est un système de régulation dépendant de la densité cellulaire qui met en évidence la capacité des bactéries à se comporter comme une entité dans un groupe et non comme une bactérie isolée. Parmi les phénomènes régulés par le QS, le plus illustratif d'un comportement social (multicellulaire) est certainement la formation d'un biofilm où les bactéries isolées ou sous forme de microcolonies sont localisées au sein d'une matrice constituée de polymères (souvent polysaccharidiques) qu'elles produisent.

Les agrégats sont considérés comme les prémices d'un biofilm ; ce phénotype laisse percevoir pour la première fois chez *Brucella* la possibilité de formation d'un biofilm dans son cycle de vie.

Le but de ce mémoire est de caractériser le phénotype agrégatif chez le mutant du QS *B. melitensis* $\Delta vjbR$. Cette caractérisation passe par les objectifs suivants :

- Caractériser microscopiquement les agrégats tant du point de vue de la présence de la matrice que de l'agrégation des bactéries qui y sont englobées.
- Déterminer par des tests biochimiques et colorimétriques si la matrice contient des exopolysaccharides et tenter de préciser leur nature.
- Tenter d'observer les constituants matriciels et déterminer leur composition et leur structure.
- Essayer de mettre en évidence des gènes impliqués dans la production de cette matrice.

RESULTATS

RESULTATS

A - Caractérisation du phénotype d'agrégation

1. Mutagenèse du gène *vjbR* et complémentations

Avant le début de ce mémoire, une étude de mutagenèse du gène *vjbR* a été menée au laboratoire (S. Bonnot, thèse en cours). VjbR est un régulateur transcriptionnel du QS chez *Brucella* qui est constitué de deux domaines fonctionnels. D'une part, un domaine N-terminal appelé domaine de liaison aux AHLs. D'autre part, le domaine C-terminal contenant un motif hélice-tour-hélice (HTH) impliqué dans la liaison à l'ADN. Plusieurs acides aminés sont très conservés entre les différents régulateurs de la famille LuxR et lors d'une étude cristallographique de TraR, le régulateur du système de QS chez *Agrobacterium tumefaciens*, il a été mis en évidence que trois d'entre eux sont impliqués dans la liaison directe de l'AHL : il s'agit du tryptophane 57 (pour le 57^{ème} aa de la protéine), de la tyrosine 61 et de l'aspartate 70 (Vannini et al, 2002).

Afin d'étudier le rôle de VjbR chez *Brucella*, une souche délétante pour ce gène (baptisée $\Delta vjbR$) a été créée par insertion de la cassette de résistance à la kanamycine dans le gène codant pour VjbR. La souche $\Delta vjbR$ est atténuée en modèle cellulaire et murin. Elle présente également un défaut d'expression de deux facteurs de virulence : l'appareil de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB* et le système flagellaire. D'autre part, il a été montré que la C₁₂-HSL est capable de réprimer l'expression de ces deux facteurs de virulence.

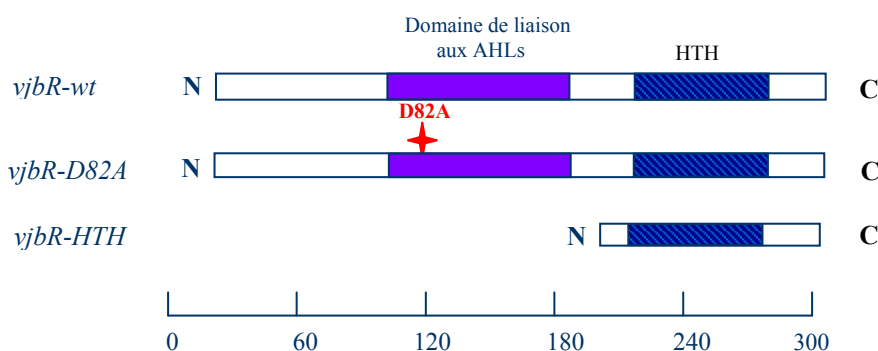


Figure 1 : Représentation des trois allèles de *vjbR* qui ont servi à compléter la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$. De haut en bas : la copie sauvage du gène *vjbR* (appelé « *vjbR-wt* »), la copie sauvage du gène *vjbR* avec une mutation ponctuelle dans le 82^{ème} acide aminé (appelé « *vjbR-D82A* ») et le fragment de gène codant pour la copie sauvage du domaine de liaison à l'ADN de VjbR (appelé « *vjbR-HTH* »). L'échelle au bas de la figure représente le nombre de paires de base.

Afin d'étudier le lien entre VjbR et les AHLs, la souche $\Delta vjbR$ a été complémentée par trois allèles de *vjbR* (figure 1) : la copie sauvage du gène *vjbR* (appelé *vjbR-wt*), le fragment de gène codant pour la copie sauvage du domaine de liaison à l'ADN de VjbR (appelé *vjbR-HTH*) et la copie sauvage du gène *vjbR* avec une mutation ponctuelle dans le résidu aspartate dans la 82^{ème} position de la chaîne polypeptidique (appelé *vjbR-D82A*). Ce résidu correspond au résidu aspartate 70 de TraR, impliqué dans la liaison directe de l'AHL chez *Agrobacterium tumefaciens*. L'aspartate 82 a été mutée en alanine par mutagenèse dirigée. Chacun de ces trois allèles a été cloné dans le site multiple de clonage (MCS) du plasmide pMR10. Des bactéries donneuses *E. coli* S17 ont été transformées par ce vecteur et ont permis le transfert conjugatif de ce plasmide dans *Brucella melitensis* $\Delta vjbR$. Il a été montré que dans les souches $\Delta vjbR$

complémentées par chacun de ces deux allèles mutés, l'expression de *virB* est restaurée, mais la C₁₂-HSL n'a plus d'effet de répression. VjbR-*HTH* et VjbR-*D82A* semblent donc incapables de lier les C₁₂-HSL et de médier l'effet de ces acyl-homosérine lactones. Les *Brucella* Δ vjbR et Δ vjbR complémentées par les allèles *vjbR-wt*, *vjbR-HTH* et *vjbR-D82A* s'agrègent en culture liquide (figure 2). Les souches Δ vjbR complémentées par les allèles *vjbR-HTH* et *vjbR-D82A* forment de plus gros agrégats que la souche délétante non complémentée. La souche sauvage (wt), quant à elle, n'a jusqu'à ce jour jamais formé d'agrégats dans ces conditions de culture. De plus, afin de savoir si ces allèles sont dominants ou récessifs, nous avons introduit ces mêmes allèles dans la souche sauvage et observé que leur présence n'engendrait pas la formation d'agrégats. Ces allèles ne sont donc pas dominants.

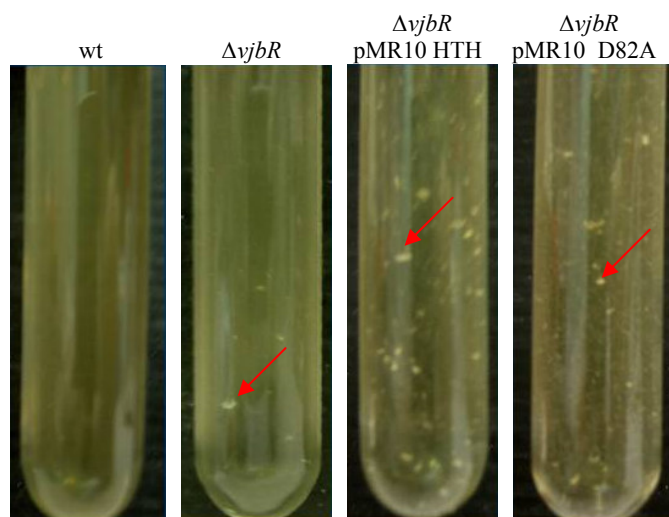


Figure 2 : Photographies de cultures liquides de *Brucella* en milieu 2YT. De gauche à droite : la souche sauvage, la souche Δ vjbR, la souche Δ vjbR complémentée avec l'allèle *vjbR-HTH*, la souche Δ vjbR complémentée avec l'allèle *vjbR-D82A*. Des agrégats bactériens sont visibles dans les trois derniers tubes (flèches).

Un tel phénotype n'a jamais été observé dans notre laboratoire. Ce mémoire a pour but de caractériser ce phénotype et de mettre en évidence les molécules impliquées dans l'agrégation.

2. Etude du phénotype d'agrégation chez *Brucella abortus*

Dans la littérature, il est généralement décrit que les bactéries forment des agrégats ou des biofilms grâce à la production d'exopolysaccharide (EPS). Chez certaines bactéries, ce sont d'autres structures de surface comme le flagelle ou les pili qui permettent l'agglomération.

B. melitensis 16M possède un locus de 25 kb comportant des gènes homologues aux gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides chez *S. meliloti* et *A. tumefaciens*, deux α -protéobactéries proches de *Brucella* (tableau 1). Il est possible que les gènes présents dans ce locus codent pour la synthèse d'un ou plusieurs EPS et qu'ils soient impliqués dans la formation des agrégats observés. D'autre part, d'autres gènes pouvant être impliqués dans la synthèse d'EPS sont présents dans le génome de *Brucella*.

Brucella abortus 2308 est une espèce de *Brucella* chez laquelle ce locus de 25 kb est absent. Si *B. abortus* ne forme pas d'agrégats dans les conditions où *B. melitensis* agrège, nous pourrions proposer qu'un exopolysaccharide est impliqué dans l'agrégation chez *B. melitensis* 16M et qu'il est encodé au moins en partie par un ou plusieurs gènes du locus de 25 kb.

Afin d'aborder le rôle potentiel des exopolysaccharides dans le phénotype observé, nous avons inséré les pMR10 portant les allèles mutés de *vjbR* dans une souche *B. abortus* Δ vjbR déjà disponible au laboratoire (R-M Delrue).

N° gène	Annotation dans Genbank	E Value
BMEII 0831	hypothetical	e-140 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0832	UDP-glucose 4-epimerase	1 e-120 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0833	Hypothetical	7 e-93 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0834	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	1 e-161 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0835	glycosyl transférase	8 e-86 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0836	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	8 e-91 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0837	glycosyl transférase	3 e-63 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0838	ExoT	1 e-105 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0839	Putative undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	3 e-33 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0840	Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis (LPS)	1 e-08 (<i>S. meliloti</i>)
BMEII 0841	hypothetical protein (différent chez <i>abortus</i>)	1 e-30 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0842	Hypothetical Protein	1 e-129 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0843	Putative colanic acid biosynthesis acetyltransferase wcaF	4 e-47 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0844	Omp31	4 e-17 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0845	Lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase	8 e-85 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0846	glycosyl transférase	1 e-130 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0847	glycosyl transférase	1 e-109 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0848	GDP-mannose 4,6-dehydratase	1 e-168 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0849	GDP-4-DEHYDRO-D-RHAMNOSE REDUCTASE	4 e-70 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0850	GDP-FUCOSE SYNTHETASE	5 e-32 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0851	Exopolysaccharide prod. Prot. exoF precursor	6 e-75 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0852	ExoP	4 e-97 (<i>A. tumefasciens</i>)
BMEII 0853	TWO COMPONENT RESPONSE REGULATOR	3 e-62 (<i>R. leguminosarum</i>)
BMEII 0854	TRANSCRIPTION REGULATOR, CRP FAMILY	5 e-44 (<i>S. meliloti</i>)

Tableau 1 : Répertoire des gènes du locus de 25 kb chez *B. melitensis*. Les gènes encadrés en jaune sont impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides chez d'autres bactéries.

Nous avons testé si les souches *B. abortus* (wt, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées) formaient des agrégats. Pour cela, nous avons ensemencé des cultures liquides de 1 ml de 2YT dans des plaques 24 puits. Ces cultures sont placées à 37°C, sous agitation et observées après 20 heures de culture en microscopie optique inversée. Nous avons observé qu'aucune de ces souches ne formaient d'agrégats (figure 3).

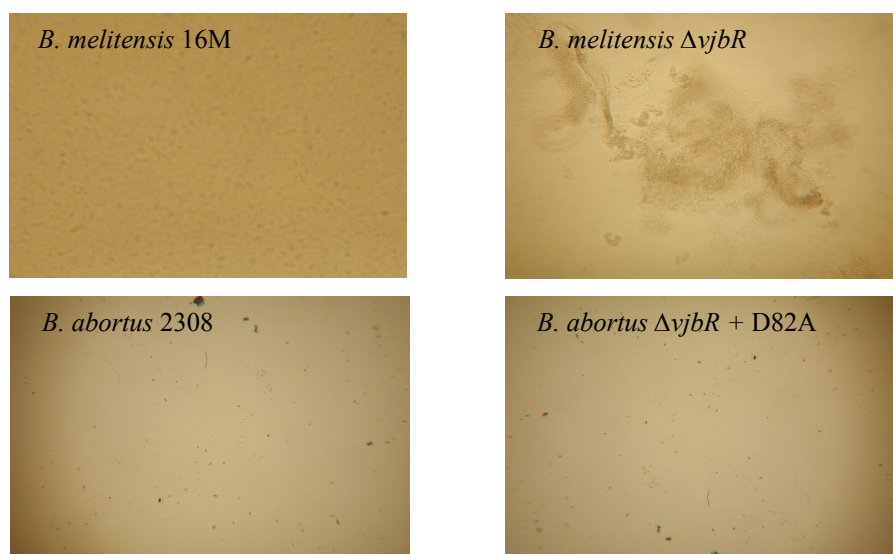


Figure 3 : Etude du phénotype d'agrégation chez *B. abortus*. Les photos ont été prises en microscopie inversée sur cultures liquides en 2YT des souches *B. abortus* sauvage et $\Delta vjbR$ complémentée par l'allèle muté *vjbR-D82A*. Les souches $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par l'allèle *vjbR-HTH* présentent le même phénotype. Contrôle négatif : *B. melitensis* wt. Contrôle positif : *B. melitensis* $\Delta vjbR$.

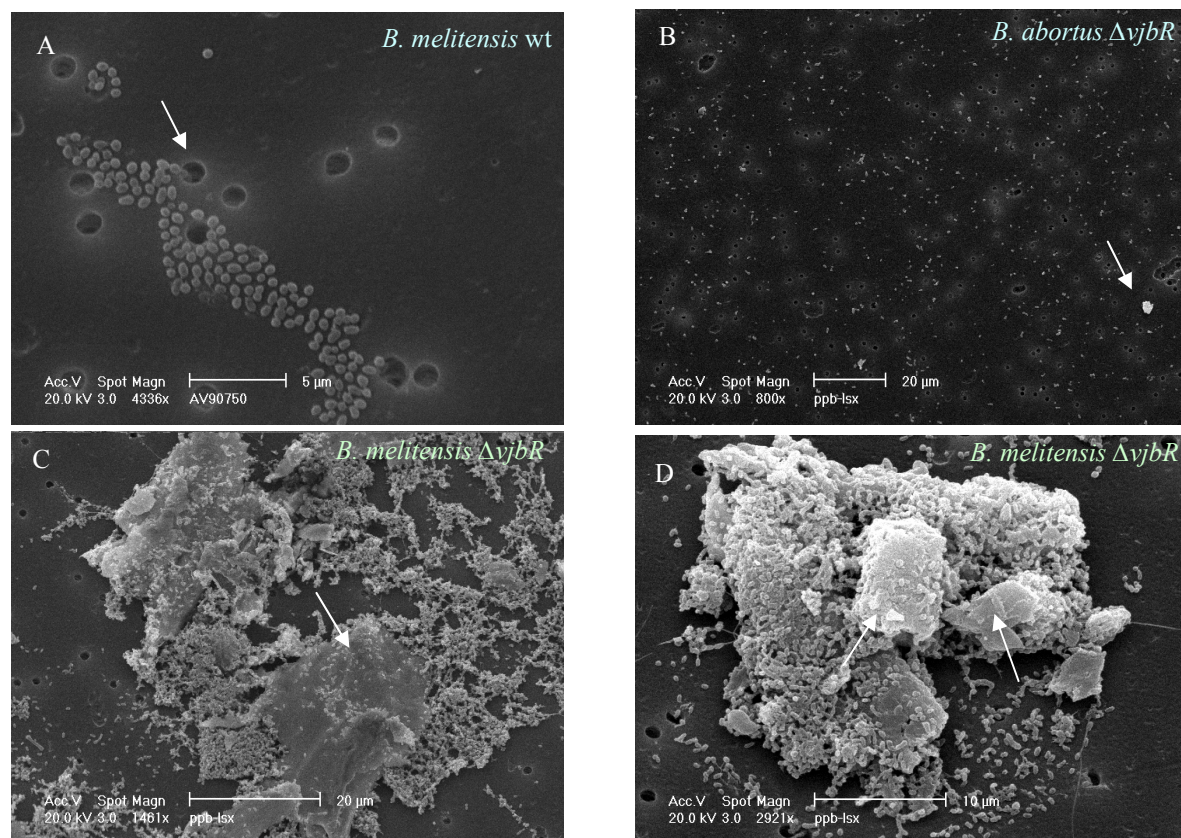
3. Etude cinétique de formation des agrégats

Les agrégats se forment transitoirement, ce qui rend l'étude de ce phénotype particulièrement difficile. Afin de connaître les temps de culture nécessaires pour obtenir les agrégats, nous avons réalisé une étude cinétique de leur formation en culture liquide à 37°C pendant 48 heures chez *B. melitensis* et chez *B. abortus*. Nous avons étudié les souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 sauvages, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par chacun des trois allèles *vjbR*-wt, *vjbR*-HTH ou *vjbR*-D82A. Pour s'assurer que l'apparition du phénotype n'est pas due à la présence du plasmide pMR10 en tant que tel, nous avons également étudié une souche *B. melitensis* et *B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 vide (sans allèle). Si ce plasmide n'a aucune influence par lui-même, le phénotype de cette souche devrait être le même que celui de la souche $\Delta vjbR$. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé des plaques 24 puits. Dans chaque puits, des triplicats de cultures liquides de 1 ml de 2YT ont été inoculées à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit de chaque souche bactérienne. Nous avons réalisé cette expérience avec ou sans agitation. Toutes les deux heures, les bactéries furent observées au microscope optique inversé.

Cette étude nous a montré que les bactéries ne forment des agrégats que sous agitation. Ils apparaissent d'une manière transitoire à partir de 15 heures de culture chez les *B. melitensis* $\Delta vjbR$ complémentées et dès 8 heures de culture chez la souche non complémentée. On observe un maximum d'agrégats à 20 heures de culture. Aucun agrégat, à aucun moment, n'a été observé avec la souche *B. melitensis* wt et ni avec les souches de *B. abortus*.

4. Observation des agrégats en microscopie électronique à balayage

Suite à l'observation en microscopie inversée, nous avons voulu observer les agrégats au microscope électronique à balayage (MEB). Ceci pourrait nous permettre de visualiser la structure responsable de la formation des agrégats. Nous avons comparé les phénotypes de *B. melitensis* 16M wt, $\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$ + pMR10 vide, $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH et ceux de *B. abortus* wt, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH. L'utilisation des plaques 6 puits contenant des cupules à fond poreux a permis de préserver les agrégats (figure 4).



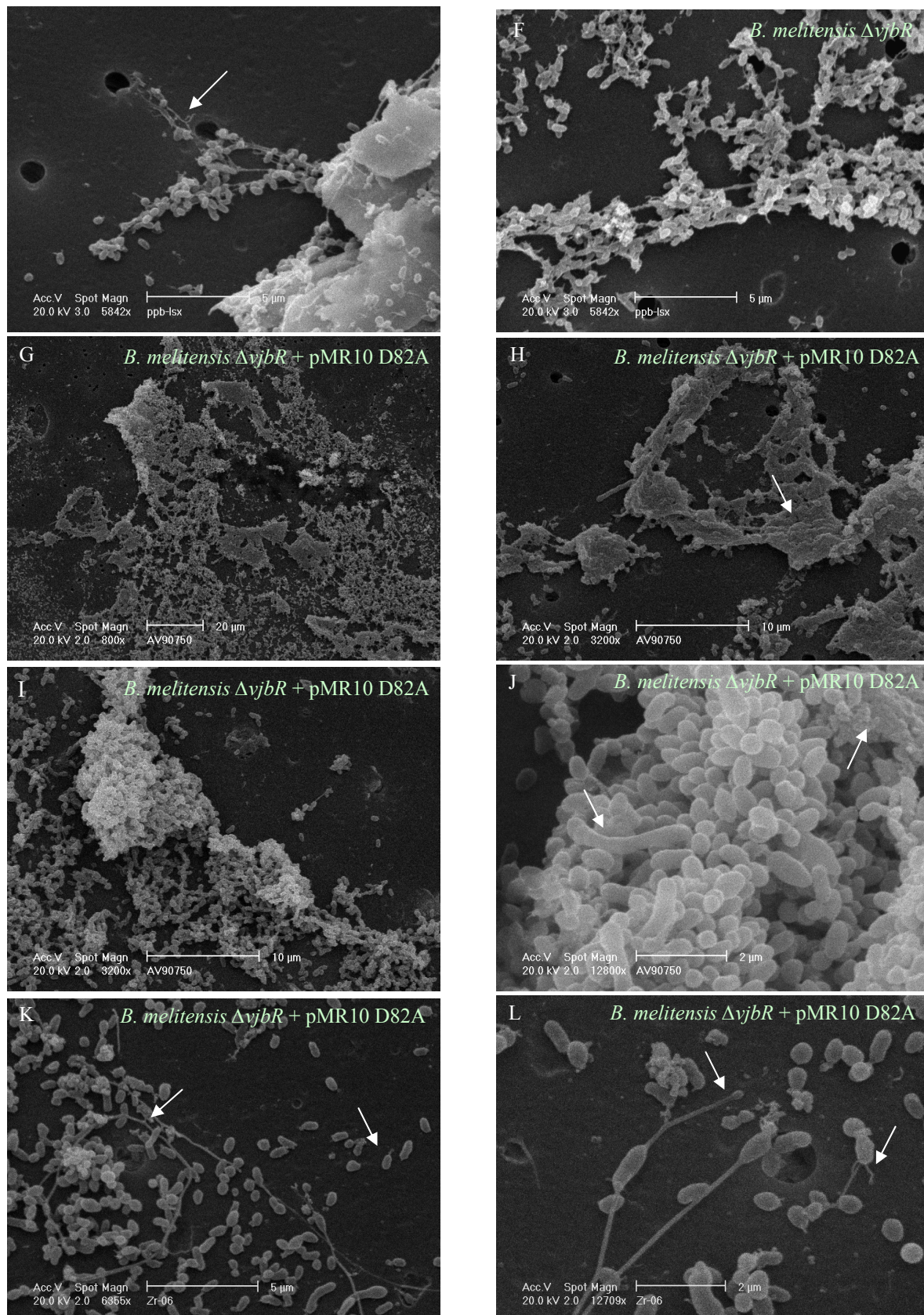


Figure 4 : Observation des agrégats au microscope électronique à balayage des souches *B. melitensis* wt (A), *B. abortus* $\Delta vjbR$ (B), *B. melitensis* $\Delta vjbR$ (C à F) et *B. melitensis* $\Delta vjbR$ complémentée par l'allèle *vjbR*-D82A (G à L). L'échelle est représentée au bas de chaque image.

De cette observation en MEB, nous pouvons retirer plusieurs informations. A première vue, les populations sauvage et mutantes de *B. melitensis* 16M affichent un phénotype très différent. Le phénotype des souches de *B. abortus* mutée ou non est très similaire à la souche *B. melitensis* sauvage.

Focalisons nous tout d'abord sur le phénotype de *B. abortus* et de *B. melitensis* 16M wt (figures 4A et 4B). Peu de bactéries sont présentes, ce qui laisse penser que bon nombre d'entre elles ont été emporté par le flux des solutions de lavage à travers les pores de la membrane de fixation. Les *Brucella* mesurent en moyenne 1 μm et les pores ont un diamètre d'un μm ; dès lors, les bactéries ont la possibilité de passer à travers ces pores. D'ailleurs, sur la majorité de ces micrographies, on peut apercevoir des bactéries dans ces pores (illustration par la flèche de la figure 4A). La taille des agrégats étant bien plus importante que le diamètre des pores, ceux-ci sont restés fixés. De temps en temps, nous avons rencontré des petits agrégats de bactéries dans ces deux souches (pointé par la flèche dans la figure 4B), mais leur taille n'égale jamais ce que nous avons observé chez les délétants complémentés ou non. Ceci confirme que *B. abortus* ne forme pas d'agrégats dans nos conditions expérimentales.

Contrairement à ce phénotype sauvage, les souches *B. melitensis* mutantes agrègent fortement (voir figures 4C à 4L). Puis, en passant aux grossissements supérieurs, on remarque que ces agrégats ne se composent pas que de bactéries.

Premièrement, les bactéries sont clairement agglomérées, mais elles sont enfouies dans ce qui pourrait être un mélange de matrice (pointée par les flèches des figures 4C, 4D, 4E (flèche de droite) et 4H) et de débris cellulaires (pointés par la flèche droite de la figure 4J). Ces observations s'accordent avec l'idée que ces bactéries pourraient établir des biofilms.

Deuxièmement, en comparaison avec la souche sauvage, il y a une augmentation de la fréquence d'un morphotype à l'allure allongée et de taille supérieure à la normale (jusqu'à 3 μm de long, voir flèche de gauche sur la figure 4J).

Troisièmement, les bactéries projettent fréquemment de longs filaments de différentes tailles entre elles (figures 4E, 4F, 4K et 4L). Ces fils semblent être adhésifs, puisqu'on y trouve l'une ou l'autre bactérie agrippées dessus (comme l'illustre par exemple la flèche de la figure 4F). Nous pouvons distinguer trois types de filaments. D'une part, ceux qui sont projetés par des bactéries formant un petit bourgeon à leur surface (ceux marqués par les flèches de gauche dans les figures 4K et 4L). D'autre part, des filaments plus longs et de faible épaisseur sur lesquels les bactéries sont capables d'adhérer (ceux qui abondent dans les figures 4E et 4F). Enfin, de fins filaments beaucoup plus courts et semblant moins adhésifs (flèches de droite des figures 4K et 4L). Nous ne connaissons ni la nature de ces filaments ni celle de la matrice, c'est pourquoi, nous allons approfondir l'observation de notre phénotype en appliquant des techniques usuelles permettant de mettre en évidence les polysaccharides.

B - Etude des exopolysaccharides impliqués dans le phénotype d'agrégation

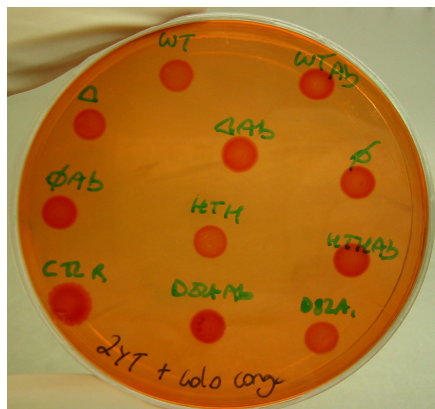
1. Mise en évidence de la présence d'exopolysaccharides (EPS)

Pour tester si un exopolysaccharide est impliqué dans la formation de nos agrégats, nous avons d'abord essayé de marquer ces polysaccharides par divers colorants de polysaccharides. Nous avons utilisé le rouge congo qui se lie aux unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl, le calcofluor qui marque le β -glycan et le cristal violet.

1.1 Marquages au rouge congo

Le rouge congo se lie aux unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl. Nous avons d'abord testé la présence de ces résidus sur des colonies en observant la fixation du rouge congo en milieu solide. Pour cela, nous avons déposé des gouttes de 5 μl de bactéries sur du milieu solide contenant 0, 01% de rouge congo. Les souches étudiées sont *B. melitensis* sauvage, $\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$

complémentée par les différents allèles de *vjbR* ainsi que par le pMR10 vide et les mêmes souches chez *B. abortus*. Comme contrôle positif, nous avons choisi une souche de *B. melitensis* mutée dans le gène de la formamyl synthétase, enzyme impliquée dans la synthèse du LPS (Lipopolysaccharide). Dépourvue de LPS, cette souche présente un phénotype rugueux (colonie mate et opaque à contours irréguliers), ce qui n'est le cas pour aucune de nos souches (figure 5).

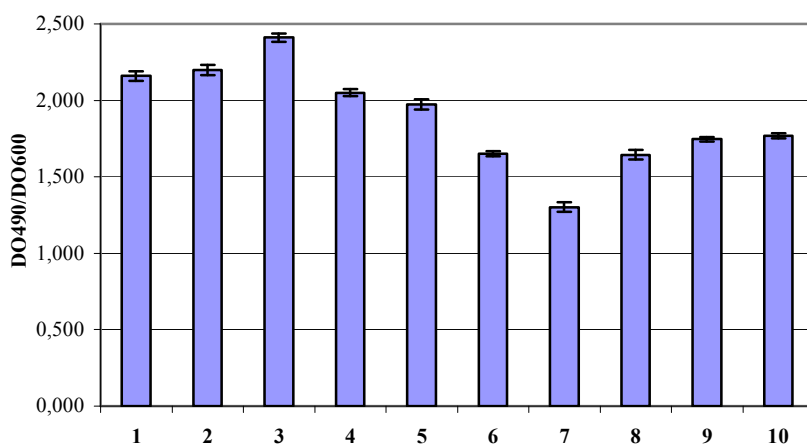


Souches testées, de gauche à droite et de haut en bas :

- B. melitensis* wt
- B. abortus* wt
- B. melitensis* $\Delta vjbR$
- B. abortus* $\Delta vjbR$
- B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 vide
- B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 vide
- B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH
- B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH
- Le contrôle Rough positif
- B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A
- B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A.

Figure 5 : Coloration des colonies de *B. melitensis* et *B. abortus* par le rouge congo.

Ici, nous observons que le contrôle rugueux est rouge, ce qui permet de nous assurer que la coloration au rouge congo est due à un autre polysaccharide que le LPS. De même, toutes les autres colonies sont rouges, ce qui signifie que toutes les colonies fixent le rouge congo et donc possèdent des unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl. Or, le LPS de *Brucella* ne contient pas ce type de liens. Ceci signifie qu'un autre polysaccharide que le LPS est présent en surface des bactéries et qu'il est marqué par le rouge congo. Il est difficile de comparer l'intensité de la coloration des colonies entre elles car nous n'avons probablement pas déposé la même quantité de bactéries dans chaque goutte. Nous pouvons donc difficilement déduire si une souche fixe plus de colorant qu'une autre. Pour remédier à cela, nous avons réalisé un dosage quantitatif au rouge congo en culture liquide. Lors de ce dosage, on mesure la quantité relative de rouge congo fixée par bactérie. Pour réaliser ce test, nous mélangeons 1 ml de culture bactérienne avec 1 ml de rouge congo. On incube ce mélange 2 heures à 37°C avant de le centrifuger. Nous dosons ensuite le rouge congo non fixé par les bactéries, qui est contenu dans le surnageant. Plus la bactérie contient d'unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl, plus elle fixera de colorant et moins on en retrouvera dans le surnageant. Nous avons réalisé ce dosage quatre fois dont trois fois en triplicats. Nous avons obtenu les mêmes résultats et les mêmes conclusions pour chaque dosage. La figure 6 présente le résultat pour une expérience représentative réalisée en triplicats.



Souches correspondant aux numéros figurés sur l'axe des abscisses :

- 1 *B. melitensis* wt
- 2 *B. melitensis* $\Delta vjbR$
- 3 *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 vide
- 4 *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH
- 5 *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A
- 6 *B. abortus* wt
- 7 *B. abortus* $\Delta vjbR$
- 8 *B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 vide
- 9 *B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH
- 10 *B. abortus* $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A

Figure 6 : Fixation du rouge congo par différentes souches de *Brucella*. L'axe des ordonnées représente le rapport DO_{490nm}/DO_{600nm} , qui correspond à la quantité de colorant non fixé par bactérie. L'axe des abscisses reprend les différentes souches étudiées.

Nous observons que les souches agglomérantes (*B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH et $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A) fixent plus de colorant que ne le font les souches de *B. melitensis* wt et $\Delta vjbR$ (ce qui signifie que les souches agglomérantes contiennent plus d'unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl). Cela dit, il n'apparaît pas de fortes différences entre les souches. Lors de cette expérience, la taille des agrégats était petite ce qui expliquerait le peu de différences observées entre les souches qui agrègent ou pas.

1.2 Marquages au calcofluor

Le calcofluor est un marqueur des polysaccharides β -D-glucan et des liaisons β -1,3 et β -1,4. les glucans sont des homopolymères de D-glucose liés de configuration β). Ce fluorochrome est couramment utilisé pour mettre en évidence la présence d'exopolysaccharides.

Dans un premier temps, nous avons testé la fixation du calcofluor par les souches *B. melitensis* wt, $\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$ + pMR10 vide, $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH, $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A et par les mêmes souches chez *B. abortus*. En pratique, nous avons déposé des gouttes de 5 μ l de chaque suspension bactérienne sur un milieu solide contenant 0, 1% de calcofluor. En présence d'exopolysaccharides, ce colorant est fixé et fluoresce sous lumière ultraviolette. Nous avons utilisé la souche *S. meliloti* comme contrôle positif. Cette souche produit deux exopolysaccharides nommés succinoglycan et galactoglucan et fluoresce donc sous UV en présence de calcofluor. Comme attendu, le contrôle positif est fluorescent sous UV (positif), mais nous n'avons observé aucun marquage avec les souches de *Brucella* étudiées.

Dans un deuxième temps, nous avons marqué ces mêmes souches en culture liquide avec du calcofluor 0, 05% pour observer les agrégats au microscope à fluorescence (figure 7).

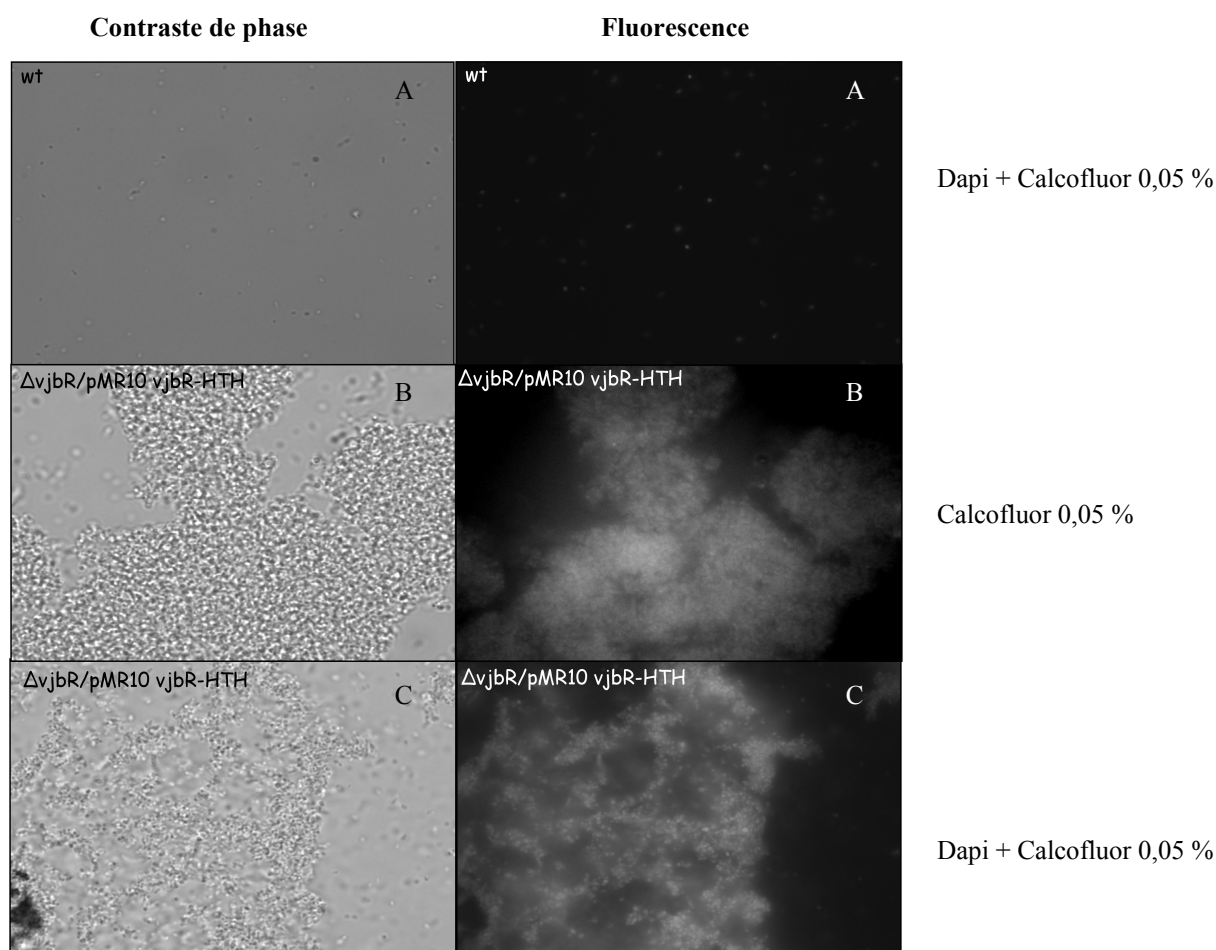


Figure 7 : Coloration des agrégats en culture liquide par le calcofluor. A et C : double marquage DAPI-calcofluor. B : marquage au calcofluor seul. Les photos ont été prises au microscope à fluorescence (grossissement 1000 fois).

La souche *B. melitensis* wt et les souches *B. abortus* ne sont pas marquées par ce colorant (figures 7A). Par contre, les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$ + pMR10 vide, $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH et $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A présentent un marquage bleu et diffus, caractéristique d'un marquage d'exopolysaccharide par le calcofluor (figures 7B). Afin de localiser les bactéries au sein des agrégats, nous avons ajouté du DAPI ou de l'iodure de propidium qui sont des agents intercalants de l'ADN. Dans le double marquage DAPI-calcofluor 0,05%, on discerne les bactéries marquées par le DAPI et la matrice marquée par le calcofluor (figures 7C).

Lorsque l'iodure de propidium a été utilisé pour visualiser les bactéries, nous avons aussi pu apercevoir de longs fils « rouges » au sein des agrégats (voir figure 8B). Le rouge étant la couleur de réémission de l'iodure de propidium, nous en inférons que ces fils sont constitués d'ADN. Ces fils ne sont pas marqués par le calcofluor (voir figure 8A). Or, dans la littérature, il est souvent admis que l'ADN est un composant de la matrice des biofilms, de nature adhésive qui permet d'améliorer l'adhésion des bactéries au sein des biofilms.

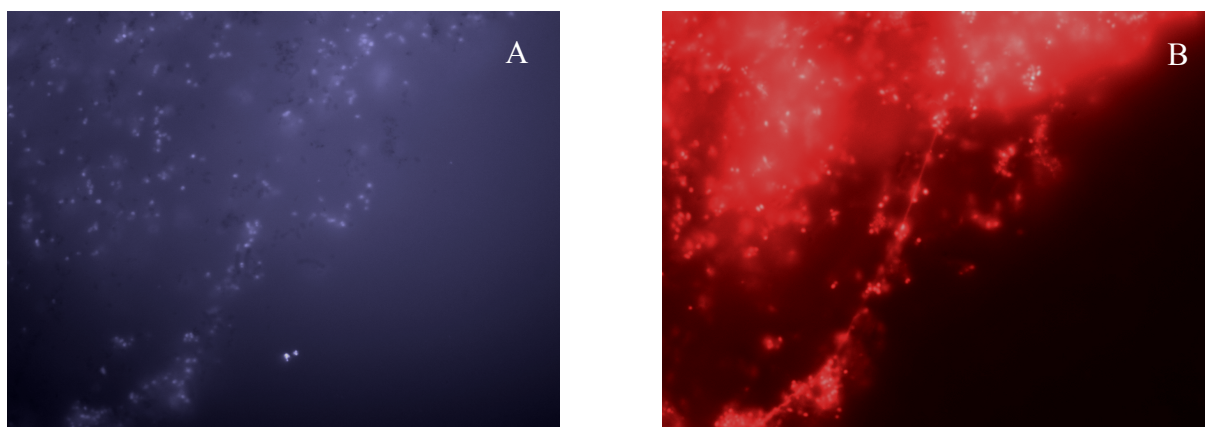


Figure 8 : Mise en évidence de la présence d'ADN au sein des agrégats formés par *Brucella melitensis* $\Delta vjbR$. A : marquage au calcofluor 0,05%. B : marquage à l'iodure de propidium. Les photos ont été prises au microscope à fluorescence (grossissement 1000x).

1.3 Test de viabilité au sein des agrégats

Si l'on se réfère à la littérature, la présence d'ADN dans la matrice provient soit de bactéries lysées déversant leur contenu dans le milieu soit d'un processus sécrétoire indépendant de la lyse. Afin d'évaluer le taux de bactéries mortes dans nos agrégats (et ainsi en inférer le taux de lyse), nous avons réalisé un test « live-dead ». Ce test est basé sur l'utilisation de deux colorants capables de marquer différenciellement les bactéries, selon qu'elles soient vivantes ou mortes. Le premier colorant, l'iodure de propidium, ne marque que l'ADN des bactéries qui y sont perméables, à savoir mortes. L'autre marqueur, le syto9, marque les bactéries vivantes et mortes. Afin d'évaluer le taux de bactéries mortes dans nos agrégats, nous avons compté la quantité de bactéries marquées par l'iodure de propidium par rapport aux bactéries marquées par le syto9. Nous avons compté environ 30% de bactéries mortes au sein de nos agrégats.

1.4 Marquage au cristal violet

Le cristal violet est communément utilisé pour révéler l'état du LPS en surface des bactéries. La coloration est basée sur les effets de charge. La chaîne O du LPS des bactéries de phénotype lisse porte beaucoup de charges négatives. Dès lors, ces charges empêchent le cristal violet de se fixer sur les bactéries et ces dernières apparaîtront blanches. Inversement, les bactéries de phénotype rugueux, qui ne possèdent pas de chaîne O au niveau de leur surface, fixent le colorant et paraissent ainsi violettes. De même, les bactéries qui produisent un exopolysaccharide sont marquées par le cristal violet et apparaissent donc violettes et ce qu'elles soient de phénotype lisse ou rugueux. Nous avons analysé la fixation de ce colorant par les bactéries à la fois sur colonies et en culture liquide.

Pour marquer les colonies, nous avons versé du cristal violet aux boîtes de culture. Nous avons réalisé cette expérience en triplicats. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, nous avons retiré le colorant et observé les colonies.

Nous observons que les colonies au sein des triplicats sont toutes de la même couleur. Si l'on compare tous les triplicats entre eux, nous observons des colonies blanches (qui ne fixent pas le cristal violet parce qu'il y a répulsion de charge) et des colonies violettes (qui fixent le cristal violet). Comme nous pouvons l'observer, les souches *B. melitensis* et *B. abortus* sauvages et $\Delta vjbR$ sont blanches, ce qui signifie qu'elles ont un phénotype lisse et possèdent du LPS. Toutes les autres souches sont violettes, ce qui sous-entend que ces souches sont dépourvues de LPS (rugueuses) ou qu'elles synthétisent un exopolysaccharide.

Nous avons réalisé un western-blot anti-core (un composant du LPS) sur les souches *B. melitensis* wt, $\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$ + pMR10 vide, $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH et $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A. Ce western-blot nous a montré que le LPS était normal. La coloration violette des colonies serait donc plutôt due à la présence d'un exopolysaccharide.

Pour marquer les bactéries en culture liquide au cristal violet, nous avons réalisé un test d'adhérence. Ce test est couramment utilisé pour mettre en évidence la formation de biofilms. Il est basé sur la fixation du cristal violet par les bactéries adhérant au support, une plaque 24 puits en polystyrène. Pour réaliser ce test, nous faisons croître des bactéries dans une plaque 24 puits contenant du milieu 2YT. Le surnageant est aspiré, les puits sont lavés avec de l'eau stérile et du cristal violet est ajouté dans chaque puits afin de marquer les bactéries adhérentes. Après avoir prélevé le cristal violet, nous pouvons observer le fond de chaque puits, mais aussi solubiliser le colorant fixé dans de l'éthanol et le doser (figure 9).

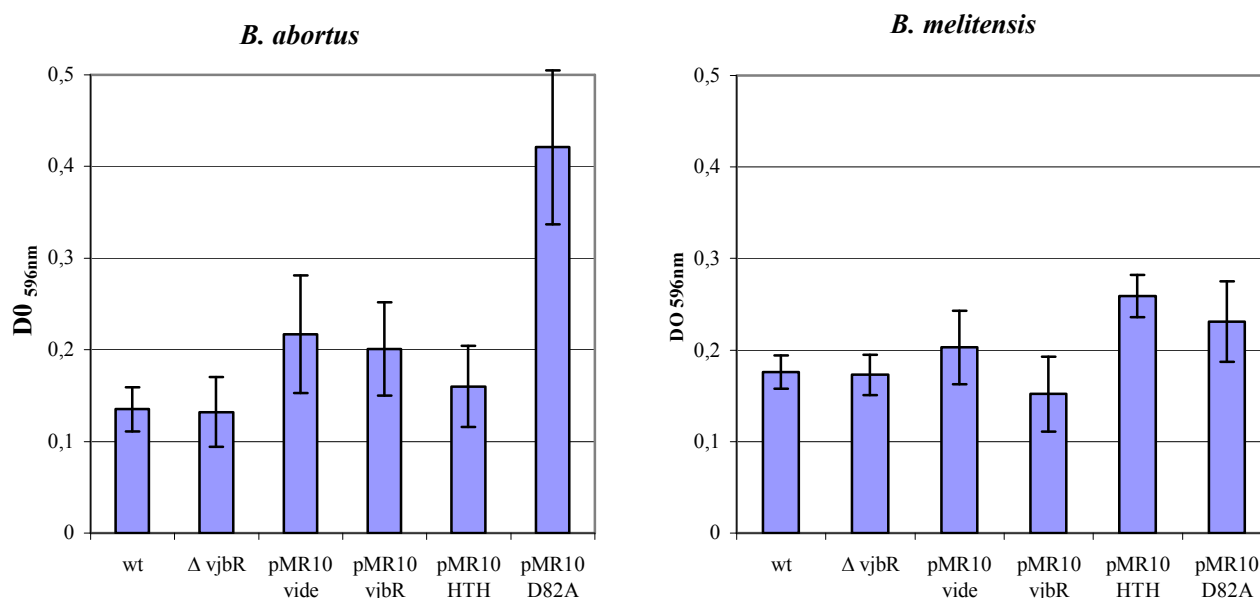


Figure 9 : Dosage du cristal violet solubilisé mesurant la quantité de colorant fixé par les bactéries adhérentes. L'axe des abscisses reprend les différentes souches étudiées tandis que l'axe des ordonnées correspond aux densités optiques à 596 nm du colorant fixé par les bactéries adhérentes.

1.5 Synthèse des tests de coloration

Pour résumer les résultats colorimétriques obtenus, la figure 10 présente un tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus avec les marquages au calcofluor, au rouge congo et au cristal violet.

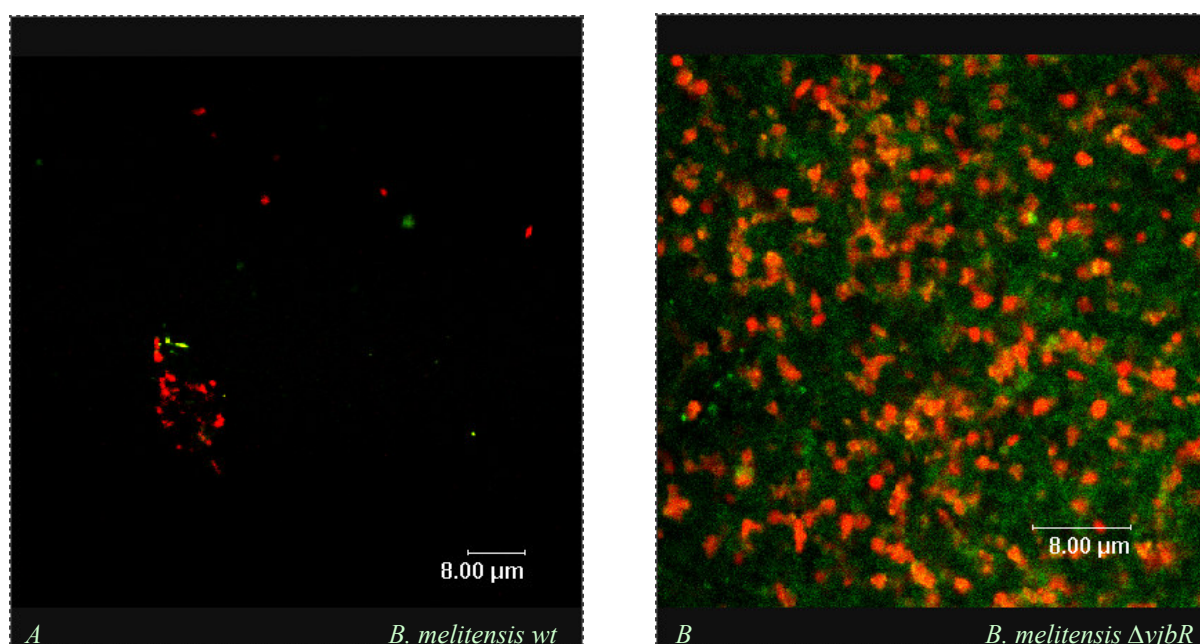
	Colonies			Culture liquide		
	wt	$\Delta vjbR$	$\Delta vjbR$ + allèles mutés	wt	$\Delta vjbR$	$\Delta vjbR$ + allèles mutés
Cristal violet	–	–	+	+	+	+++
Rouge congo	+	+	+	+	++	++
Calcofluor	–	–	–	–	+	+

Figure 10 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les marquages au calcofluor, au rouge congo et au cristal violet.

1.6 Marquage du polysaccharide par la concanavaleine-A couplée au FITC

Suite au marquage diffus obtenu au sein des agrégats par le calcofluor, nous avons décidé d'appliquer une stratégie plus spécifique que le calcofluor pour mettre en évidence un éventuel exopolysaccharide. Nous avons employé la concanavaleine A, une lectine fixatrice de résidus α -glucopyranosyl et α -mannopyranosyl. Cette lectine étant conjuguée au fluorochrome FITC (émettant dans le vert), nous avons pu localiser tous les résidus fixés par la concanavaleine-A. Avec cette technique, nous espérons faire apparaître une matrice polysaccharidique dans laquelle les bactéries seraient englobées, ce qui signifierait qu'au moins un exopolysaccharide est présent dans les agrégats. Pour distinguer les bactéries au sein de ce marquage, nous avons doublé ce premier marquage par un marquage à l'iodure de propidium (émettant dans le rouge). Ce dernier est un agent intercalant de l'ADN.

Nous avons ainsi observé deux souches : *B. melitensis* 16M et *B. melitensis* $\Delta vjbR$. Nous ne présentons, ici, que les double marquages (figure 11).



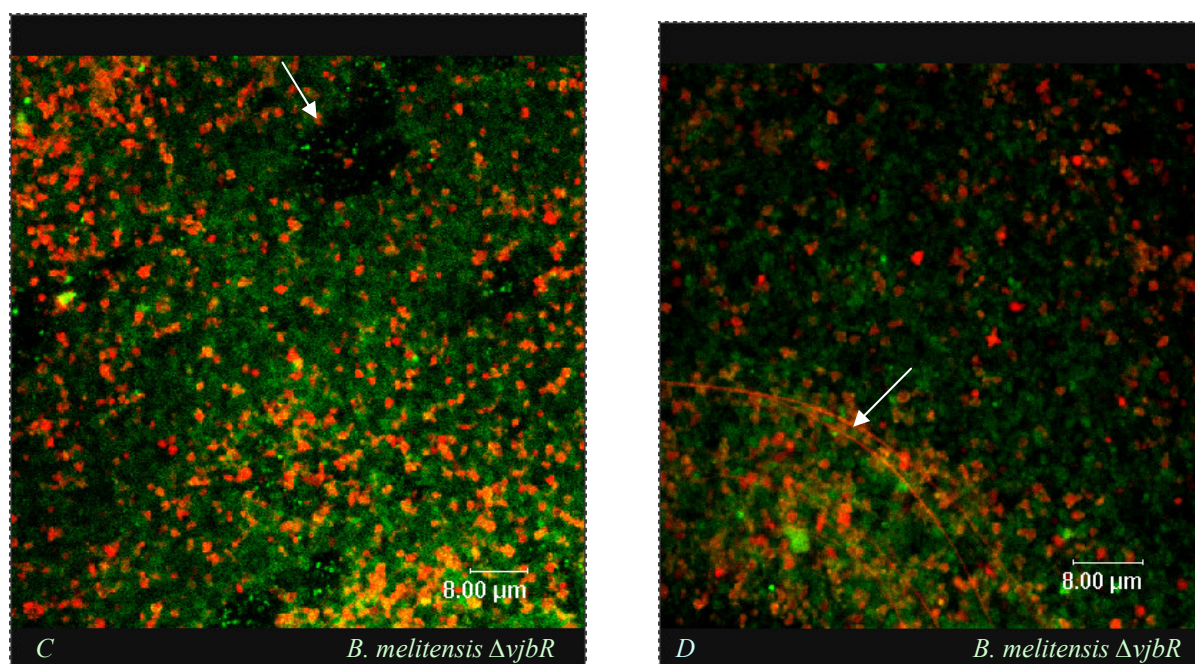


Figure 11 : Marquage des agrégats par la concanavoline A-FITC. Les photos ont été prises au microscope confocal. La coloration rouge correspond aux bactéries marquées par l'iodure de propidium, la coloration verte à la lectine concanavoline A conjuguée au FITC.

A nouveau, au premier abord, les populations sauvage et mutante de *B. melitensis* 16M affichent un phénotype très différent. Dans la souche mutante, nous remarquons aisément un marquage vert diffus, correspondant à des résidus glucoses et ou mannoses marqués par la concanavoline A-FITC. Ce marquage nous permet maintenant d'affirmer la présence d'un exopolysaccharide. Ce type de marquage a déjà été vu pour d'autres espèces bactériennes capables de synthétiser un exopolysaccharide. Les zones noires (dont une est pointée par la flèche de la figure 11C) représentent des zones non marquées, à savoir sans ADN ni glucose ou mannose. Dans la figure 11D, on observe de nouveau des fils d'ADN (pointés par la flèche), marqués par l'iodure de propidium, comme on a déjà pu l'observer en microscopie à fluorescence (figure 8). Néanmoins, la préparation des échantillons pour la microscopie confocale nécessitant la fixation des bactéries par la PFA, cet ADN pourrait également provenir de là.

2. Mutagenèse par intégration disruptive de trois gènes du locus de 25kb

Grâce aux études microscopiques et colorimétriques comparatives entre les souches de *B. melitensis* et *B. abortus*, nous avons montré que *B. abortus* ne formait pas d'agrégats. De plus, nous avons montré que le phénotype d'agrégation des mutants *vjbR* est dû au moins en partie à la production d'un exopolysaccharide. Cet exopolysaccharide est absent dans les souches *B. abortus* correspondantes ($\Delta vjbR$, $\Delta vjbR$ + pMR10 vide, $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH, $\Delta vjbR$ + pMR10 D82A). Dans le but d'identifier les gènes responsables de la synthèse de cet EPS, le locus de 25 kb qui comprend essentiellement des gènes impliqués dans la biosynthèse d'exopolysaccharides chez *A. tumefaciens* et *S. meliloti* et qui est présent chez *B. melitensis* et absent chez *B. abortus* nous a semblé être un excellent candidat. Parmi les quinze gènes impliqués dans la synthèse du succinoglycan chez *S. meliloti*, neuf sont conservés chez *B. melitensis* (voir figure 12). Or, seulement trois des neuf gènes que *B. melitensis* a conservés sont des glycosyl transférases. Cependant, *Brucella* possède cinq autres glycosyl transférases non homologues à celles de *S. meliloti*.

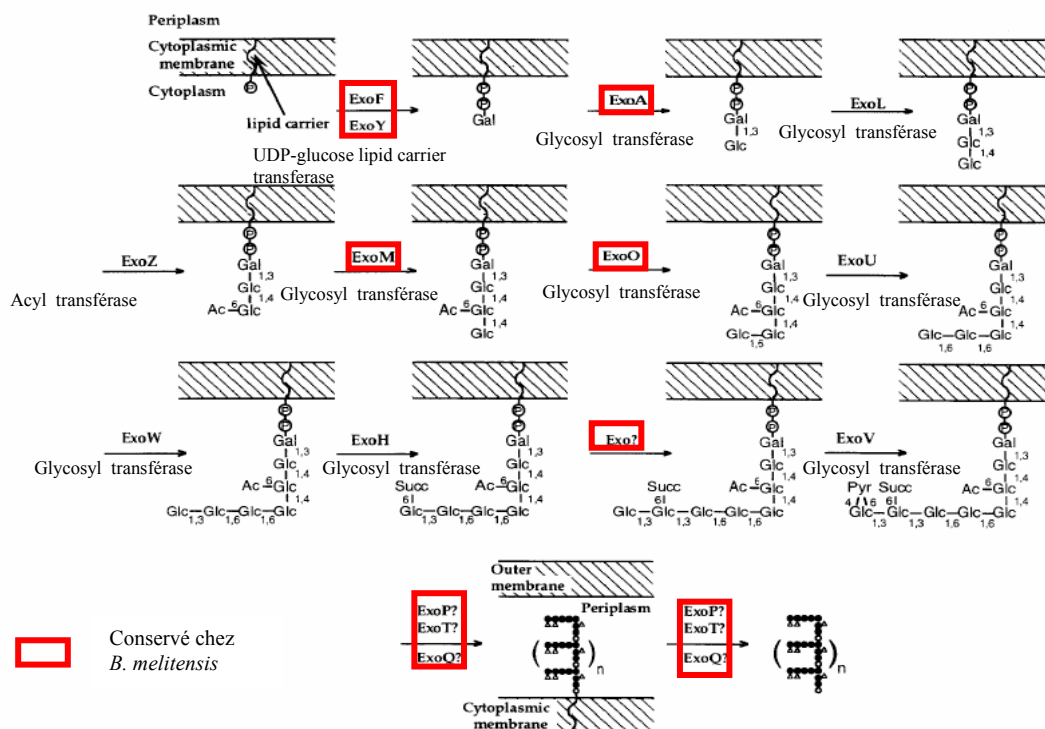


Figure 12 : Modèle de la synthèse et de l'export du succinoglycan chez *S. meliloti*. Abréviations : Glc : glucose, Gal : galactose, P : phosphate, Ac : acétyl, Succ : succinyl, Pyr : pyruvyl,. L'activité de l'enzyme est citée sous chaque flèche.

Dans le but de trouver un des gènes responsables du phénotype d'agrégation, nous avons choisi de disrupter trois gènes du locus de 25 kb. N'ayant aucun indice pour suspecter l'implication de l'un ou l'autre gène, nous avons choisi de disrupter deux gènes : *exoA*, une glycosyl transférase catalysant le transfert du premier glucose sur le galactose fixé au « lipid carrier » et *exoT*, une translocase permettant l'exportation de l'exopolysaccharide néoformé. De plus, comme il a déjà été montré chez plusieurs autres espèces bactériennes que les protéines de membrane externe (Omp) pouvaient intervenir dans l'export d'EPS, nous avons également disrupté *omp31*, le seul gène de ce locus codant pour une protéine de membrane externe (Omp31).

Nous avons donc construit les doubles mutants *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$, *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoT$ et *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$ et recherché la présence ou l'absence d'agrégats dans ces souches. Les pMR10 HTH et pMR10 D82A ont été insérés dans les doubles mutants obtenus afin d'observer le phénotype.

2.1 Construction des plasmides de disruption *pSKoriT-exoA*, *pSKoriT-exoT* et *pSKoriT-omp31*

Nous avons utilisé le *pSKoriT-cat*, plasmide encodant la résistance au chloramphénicol, mais incapable de se répliquer chez *Brucella* (plasmide suicide). Les *Brucella* ne résisteront donc à cet antibiotique que si elles ont intégré ce plasmide dans leur génome. Un fragment interne d'environ 300 paires de bases de chacun des trois gènes a été amplifié par PCR et été cloné dans le site multiple de clonage (MCS) du *pSKoriT-cat*. Il est nécessaire de préciser que le *pSKoriT-cat* possède un promoteur *plac*, inductible au lactose ou à l'IPTG, régulant la transcription du gène *lacZ'*, codant pour l'ultime sous-unité nécessaire pour obtenir une β -galactosidase fonctionnelle. Nous avons inséré nos produits PCR dans le gène *lacZ'*, ce qui permet de sélectionner les bactéries contenant des vecteurs recombinants par le test blanc-bleu. Ensuite,

nous avons criblé les vecteurs ayant intégré les produits PCR dans le sens opposé au *plac* afin que ces inserts ne soient pas sous le contrôle de ce promoteur (figure 13).

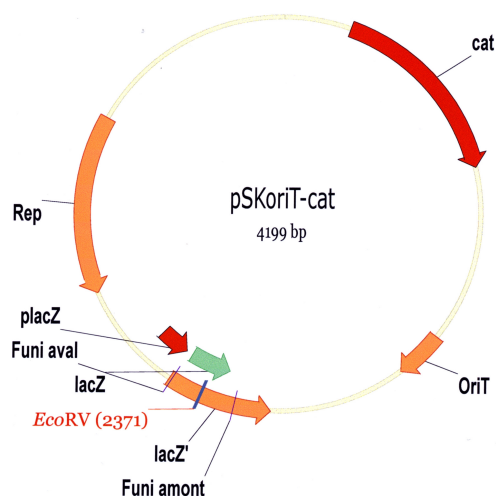


Figure 13 : Représentation schématique du pSKoriT-*cat*. Abréviations : oriT : origine de transfert, Rep : origine de réplication, *cat* : le gène de résistance au chloramphénicol. Le gène *lacZ'* et son promoteur *placZ* ainsi que le site *EcoRV* où ont été cloné les fragments de gènes *exoA*, *exoT* ou *omp31* sont également représentés. Funi amont correspond à l'endroit où s'hybridera l'amorce Funi que nous allons utiliser pour déterminer l'orientation de l'insert.

- **Amplification des régions internes des gènes *exoA*, *exoT*, *omp31***

La région interne des trois gènes à disrupter a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de *B. melitensis*. Les caractéristiques de chaque amorce utilisée est reprise dans la partie matériel et méthodes. Nous avons utilisé la Taq polymérase « high fidelity » qui génère des bouts francs sur les fragments amplifiés. Les produits PCR (amplicons) obtenus ont été analysés sur gel. On a montré que la taille des produits PCR correspondait à la taille attendue (271 pb pour *exoA*, 318 pb pour *exoT* et 341 pb pour *omp31*). Ces amplicons ont ensuite été cloné dans le pSKoriT-*cat*.

- **Linéarisation du pSKoriT-*cat***

Utilisant une stratégie de clonage à bouts francs, nous avons restreint nos plasmides avec une enzyme générant des bouts francs, à savoir *EcoRV*. Cette enzyme ne possède qu'un site de coupure sur le pSKoriT-*cat*, ce qui permet la linéarisation du plasmide.

- **Clonage des amplicons dans le pSKoriT-*cat***

Une réaction de ligation a permis de cloner chacun des trois produits PCR dans les pSKoriT-*cat* linéarisés par *EcoRV*. Les produits de ligation ont été insérés dans des *E. coli* DH10B par transformation. Les bactéries ont été étalées sur un milieu sélectif LB additionné de chloramphénicol, d'IPTG et de X-gal.

- **Analyse des clones recombinants**

Ce clonage permettant une sélection blanc/bleu (les vecteurs ayant intégré l'insert sont blancs car ont le gène *lacZ'* disrupté), nous avons testé cinq colonies blanches et cinq colonies bleues pour chacune des trois transformations. Leur ADN plasmidique a été extrait par minipréparations et analysé sur gel d'agarose.

- **Détermination du sens de l'insert par rapport au promoteur de *lacZ'***

A ce stade, les plasmides ont incorporé les amplicons homologues au fragment interne de chaque gène à déléter. Pour déterminer si les plasmides ont incorporé ces inserts dans le sens opposé au *plac*, une PCR diagnostique sur colonies a été réalisée.

Les amorces utilisées sont l'amorce amont ou aval spécifique du fragment interne cloné (Fsp et Rsp respectivement) et l'amorce «Forward universel» (Funi) qui s'hybride sur le MCS du pSKoriT-cat (figure 14). Si l'insert se trouve dans le sens opposé au *plac*, seul le couple d'amorce Rsp-Funi permettra une amplification.

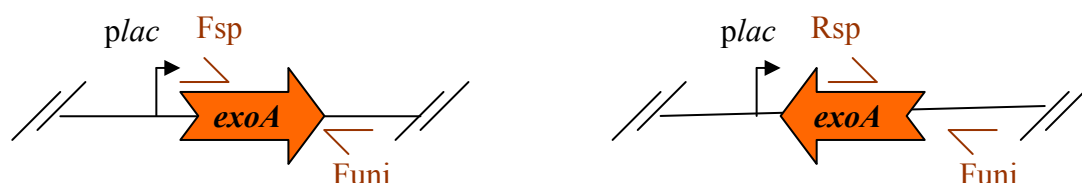


Figure 14 : Localisation de l'hybridation des amorces Funi amont, Rsp et Fsp utilisées pour la PCR servant à déterminer l'orientation des inserts *exoA*, *exoT*, *omp31* par rapport au *plac*.

Pour vérifier dans quel sens les inserts ont été clonés, les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose (figure 15). Si l'insert est cloné dans le sens opposé au *plac*, une bande d'environ 300 pb doit être observée dans les pistes correspondant aux plasmides amplifiés par la paire de primers Funi/Rsp. La taille attendue pour un clone recombinant avec l'insert dans le sens opposé au *plac* est une bande de 393 pb pour le pSKoriT-cat *exoA*, 440 pb pour le pSKoriT-cat *exoT* et de 463 pb pour le pSKoriT-cat *omp31*.

En conclusion, le pSKoriT-cat *exoT* de la piste 2, le pSKoriT-cat *omp31* de la piste 4 et le pSKoriT-cat *exoA* de la piste 6 ont été sélectionnés pour la construction des mutants disruptifs des gènes *exoA*, *exoT* et *omp31* chez *B. melitensis* 16M Δ vjbR.

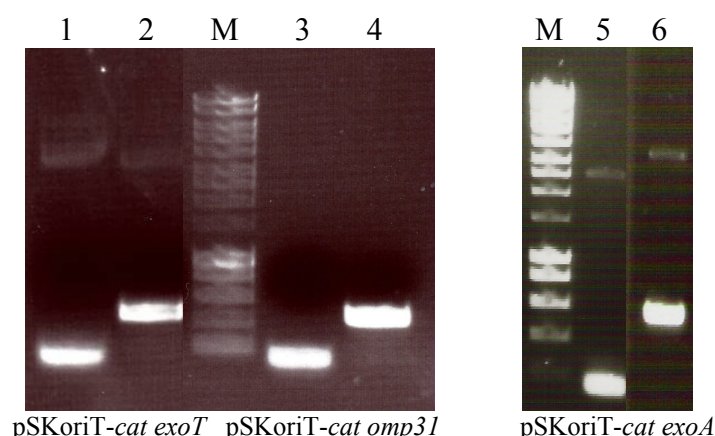


Figure 15 : Détermination de l'orientation des inserts *exoA*, *exoT* et *omp31* dans le pSKoriT-cat. Des PCR ont été effectuées sur l'ADN plasmidique des clones pSKoriT cat *exoA*, *exoT* ou *omp31* recombinants. Deux couples d'amorces sont testés sur chaque clone pour vérifier le sens de l'insert par rapport au *plac*: Funi/Fsp et Funi/Rsp.

Piste 1 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *exoT* amplifié par la paire d'amorces Funi et Fsp

Piste 2 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *exoT* amplifié par la paire d'amorces Funi et Rsp

Pistes M : marqueur de poids moléculaire (Bioline).

Piste 3 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *omp31* amplifié par la paire d'amorces Funi et Fsp.

Piste 4 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *omp31* amplifié par la paire d'amorces Funi et Rsp.

Piste 5 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *exoA* amplifié avec la paire d'amorce Funi et Fsp.

Piste 6 : clone recombinant pour le pSKoriT-cat *exoA* amplifié avec la paire d'amorce Funi et Rsp

2.2 Obtention de disruptants chez les *B. melitensis* Δ vjbR

Des bactéries *E. coli* S17 ont été transformées par les pSKoriT-cat *exoA*, pSKoriT-cat *exoT* et pSKoriT-cat *omp31* obtenus. Les bactéries transformées sont étalées sur milieu LB additionné des antibiotiques streptomycine et chloramphénicol. Ce milieu sélectif permet de ne sélectionner que les bactéries *E. coli* S17 (résistantes à la streptomycine et sensibles au chloramphénicol) qui auront reçu le plasmide chloramphénicol résistant. Enfin, ces bactéries donneuses ont cédé leur

plasmide aux *B. melitensis* $\Delta vjbR$ par transfert conjugatif. Les candidats sont sélectionnés sur un milieu 2YT additionné des antibiotiques acide nalidixique, chloramphénicol et kanamycine et leur phénotype étudié (voir paragraphe suivant). Nous n'avons pas disposé du temps nécessaire pour vérifier le génotype des doubles mutants par PCR ou par Southern blot ; ces expériences font donc partie des perspectives de ce travail. Néanmoins, nous avons testé le phénotype des clones obtenus ainsi que leur profil de coloration en présence de cristal violet.

2.3 Construction des plasmides de complémentation pMR10 nat vjbR, pMR10 nat HTH et pMR10 nat D82A

Afin d'observer si les double mutants obtenus sont encore capables de former des agrégats, nous souhaitons les compléter avec les trois allèles de *vjbR* préalablement utilisés. En effet, ces allèles conférant un phénotype d'agrégation plus important que l'absence de *vjbR*, il sera plus aisé de voir la disparition du phénotype dans de telles souches. Pour cela, nous avons l'intention de transférer les pMR10-cat *vjbR*, pMR10-cat HTH ou pMR10-cat D82A disponibles au laboratoire (S. Bonnot, thèse en cours) dans les *B. melitensis* $\Delta vjbR$. Cependant, nous avons rencontré un problème de sélection. En effet, les bactéries ayant intégré l'un des pSKoriT *exoA*, *exoT* ou *omp31* résistent à la kanamycine et au chloramphénicol, résistance également portée par les pMR10. Il ne sera donc pas possible de sélectionner les bactéries ayant reçu les pMR10 portant les allèles mutés.

L'étape de complémentation des *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$, $\Delta vjbR/\Delta exoT$ ou $\Delta vjbR/\Delta omp31$ par l'un des trois allèles de *vjbR* portés sur les pMR10 a donc nécessité le remaniement de ces vecteurs. Nous avons choisi d'insérer le gène *nat*, conférant la résistance à la nouséothricine dans le gène *cat* des pMR10-cat porteurs d'un allèle de *vjbR* (figure 16). Les vecteurs résultants seront appelés pMR10-nat *vjbR*, pMR10-nat HTH et pMR10-nat D82A.

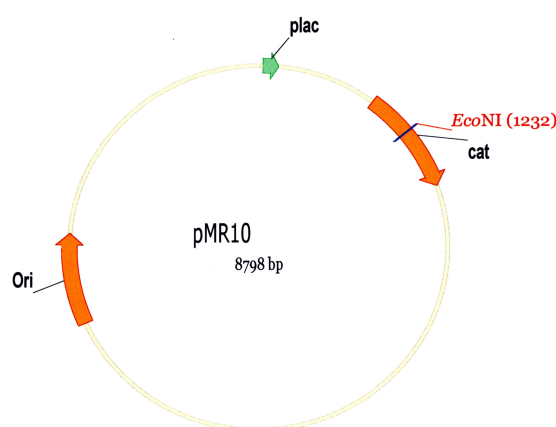


Figure 16 : Schéma du pMR10. ori : origine de réplication, *plac* : promoteur du gène *lacZ*, *cat* : le gène de résistance au chloramphénicol et *EcoNI* : l'endroit où nous allons insérer la cassette *nat* conférant la résistance à la nouséothricine.

• Obtention du gène *nat*

Nous avons isolé le gène de résistance à la nouséothricine à partir du vecteur pF6 *nat*, disponible au laboratoire. Pour ce faire, nous avons restreint ce plasmide avec *SacI*, enzyme possédant des sites de restriction de part et d'autre du gène *nat*. Ensuite, nous avons fait un filling sur ce produit de digestion afin de transformer les extrémités protrudantes en extrémités franches. Enfin, nous avons fait migrer ce produit sur un gel d'électrophorèse et purifié le fragment d'ADN correspondant.

• Linéarisation des pMR10 porteurs d'un allèle *vjbR*

Pour pouvoir insérer le gène *nat* dans les pMR10 *cat* portant un des allèles de *vjbR*, nous avons restreint ces plasmides par une enzyme générant des bouts francs, à savoir *EcoNI*. Le

pMR10-*cat* ne contient qu'un seul site de restriction reconnaissable par cette enzyme qui est situé dans le gène *cat*. Cette restriction linéarise donc vecteur au niveau du gène *cat*.

- **Clonage du gène *nat* dans les pMR10**

Le gène *nat* purifié a été mis en présence des plasmides pMR10-*cat* porteurs d'un allèle de *vjbR* et linéarisé par une restriction *Eco*NI dans une réaction de ligation. Ensuite, des bactéries *E. coli* DH10B ont été transformées par le produit de ligation, puis étalées sur le milieu sélectif LB additionné de nouséothricine.

- **Analyse des clones recombinants**

Comme nous ne connaissons pas la séquence de la cassette *nat*, nous ne pouvons vérifier les clones recombinants ni par restriction diagnostique ni par PCR. Pour analyser si les clones recombinants ont bien inséré le gène *nat* dans le gène *cat*, nous avons fait croître les clones recombinants sur un milieu contenant de la nouséothricine d'une part et sur un milieu contenant du chloramphénicol d'autre part. Les clones d'intérêt doivent être sensibles au chloramphénicol et résistants à la nouséothricine. A l'analyse, nos clones recombinants résistent à la nouséothricine et sont sensibles au chloramphénicol.

Nous n'avons pas disposé du temps nécessaire pour insérer ces plasmides pMR10 dans les disruptants.

2. Observation du phénotype des disruptants

Pour observer si les doubles mutants $\Delta vjbR/\Delta exoA$, $\Delta vjbR/\Delta exoT$ ou $\Delta vjbR/\Delta omp31$ sont capables d'agréger, nous avons inoculé des triplicats de cultures liquides en plaque 24 puits de 1 ml de 2YT à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit. Les antibiotiques adéquats ont été additionnés au milieu de culture. Les contrôles ont été réalisés au moyen des souches *B. melitensis* wt et $\Delta vjbR$. Nous avons surveillé la formation des agrégats de ces souches en les observant au microscope optique inversé à plusieurs reprises pendant 48 heures.

Comme attendu, nous avons observé que la souche sauvage ne formait pas d'agrégats alors que la souche délétante agrégeait. Par contre, les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$ et *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoT$ s'agglomèrent et ce d'une manière plus importante que la souche délétante. Nous en concluons que les disruptions des gènes *exoA* et *exoT* n'empêchent pas les *Brucella* de s'agréger. Quant à la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$, elle ne forme que de petits agrégats à partir de 24 heures de culture. A ce temps de culture, les autres souches disruptantes forment des agrégats plus conséquents.

En présence de cristal violet, la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoT$ est violette, ce qui signifie que cette souche produit toujours un exopolysaccharide ou est dépourvue de LPS (cependant les colonies ne présentent pas les caractéristiques d'une souche rugueuse). Inversement, les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$ et *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$ sont blanches, ce qui signifie qu'elles ont un LPS et ne produisent pas ou peu d'exopolysaccharide.

3. Extraction des exopolysaccharides de *Brucella melitensis* 16M

Les études colorimétriques et microscopiques que nous avons réalisées, nous ont permis de mettre en évidence un exopolysaccharide chez les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles mutés de *vjbR*. Dans le but de caractériser et d'identifier cet exopolysaccharide par résonance magnétique nucléaire, nous avons tenté d'isoler cette molécule.

3.1 Purification de l'exopolysaccharide

La purification de l'exopolysaccharide se fait via la précipitation des exopolysaccharides d'un surnageant de culture bactérienne avec de l'éthanol 95% froid. Les exopolysaccharides sont récupérés et une étape de dialyse permet d'éliminer tous les monomères saccharidiques contaminants. Nous avons appliqué ce protocole dans un premier temps aux souches *B.*

melitensis wt et $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH. Comme contrôle, nous avons choisi le milieu 2YT dans lequel les bactéries sont ensemencées. A chaque fois, nous avons réalisé un dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois sur les produits d'extraction obtenus. Nous avons également hydrolysé le(s) exopolysaccharide(s) obtenu(s) afin de pouvoir caractériser leur composition par HPLC (chromatographie liquide à haute pression). Enfin, nous avons vérifié la pureté de nos échantillons en réalisant des dot blots avec différents anticorps disponibles au laboratoire.

3.2 Détermination de la concentration en sucre de chaque échantillon

Nous avons dosé les sucres totaux contenus dans nos échantillons par la méthode de Dubois. Nous avons réalisé ce dosage six fois et avons remarqué la faible reproductibilité du dosage. Néanmoins, nous avons exploité les résultats obtenus pour tenter de déceler une information intéressante. Nous n'avons pas tenu compte des dosages peu concordants et avons réalisé une moyenne pour les dosages restants. Nous avons observé une concentration en sucres totaux chez la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH de 147, 71 mg/l et de 128, 85 mg/l chez la souche sauvage (ces résultats ont été normalisés à la quantité de bactérie dans la culture).

3.3 Vérification de la pureté des échantillons par dot-blots

Le protocole que nous avons utilisé extrait aspécifiquement tous les polysaccharides du milieu. Ceci implique que nos échantillons finaux pourraient contenir des polysaccharides autres que les EPS, comme du LPS soit libre soit associé à des « blebs » (il s'agit de vésicules de membrane externe). Pour savoir si nos échantillons contiennent ce type de polysaccharide contaminant, nous avons réalisé des dot blots. Cette technique nous permet de mettre en évidence l'éventuelle présence de LPS ou de protéines Omp (outer membrane protein) par immunodétection. Nous avons déposé des dilutions sériées de 2 en 2 de nos échantillons sur une membrane de nitrocellulose et les avons mis en présence d'anticorps. Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux anti-LPS pour tester la présence de LPS, anti-Omp16, anti-Omp25, anti-Omp31, anti-Omp36 et anti-Omp89 pour tester la présence de ces différentes protéines membranaires reflétant la présence de blebs. Pour pouvoir comparer l'intensité de la contamination entre les échantillons, nous avons mis ceux-ci à concentration de sucres égale. Les résultats sont présentés dans la figure 17.

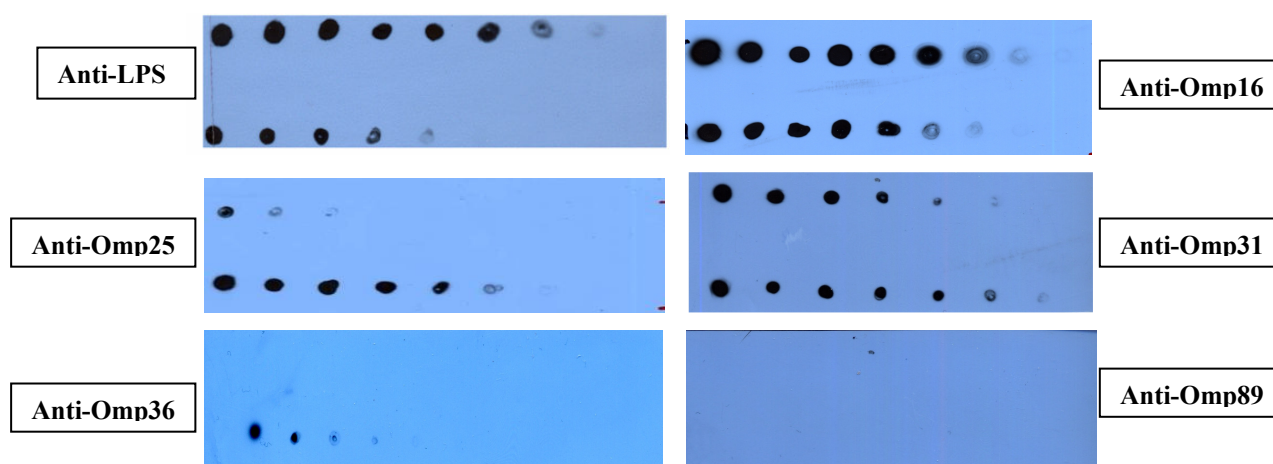


Figure 17 : Estimation de la contamination de la préparation d'exopolysaccharides par d'autres sucres. Ces dot blots sont réalisés sur les fractions remises à même concentration de sucres résultant de l'extraction des EPS de *Brucella*. La première ligne de chaque dot blot correspond aux dilutions sériées de 2 en 2 de la souche sauvage et la dernière ligne correspond aux dilutions de la souche $\Delta vjbR$ complémentée par l'allèle *vjbR-HTH*. L'anticorps primaire utilisé est mentionné dans le cadre présent à l'une des extrémités de chaque dot blot.

En observant ces dot blots, nous remarquons que nos échantillons sont contaminés par du LPS et par des blebs. La fraction de la souche sauvage comprend plus d'Omp16 et plus de LPS que la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH. Les sucres étant à même concentration, ceci signifie qu'un autre sucre que LPS est présent en quantité plus importante dans la fraction correspondant à la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH. Cette préparation contient également plus d'Omp31, d'Omp36 et surtout d'Omp25 que la souche sauvage. Enfin, aucune de ces préparations ne contient l'Omp89.

3.4 Hydrolyse acide des échantillons et HPLC

Afin de caractériser les monomères qui composent l'exopolysaccharide éventuellement présent dans les préparations, nous avons réalisé une hydrolyse acide sur nos échantillons finaux. Pour identifier les monomères, nous avons utilisé l'HPLC avec une colonne échangeuse d'ions et un système de détection par ampérométrie pulsée. Nos échantillons sont injectés dans cet appareil en parallèle avec des monomères standards de concentration 100 mg/litre : glucose, galactose, fucose, rhamnose, arabinose, mannose, xylose et glucosamine.

Nous observons différents pics, chacun correspondant à un monosaccharide (figure 26). A première vue, nous n'observons pas de différence dans les temps de rétention, mais bien dans la quantité des monomères présents dans les échantillons correspondant aux souches *B. melitensis* wt et $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH et ceux présents dans l'échantillon qui correspond au 2YT. Ceci laisse penser que les seuls polysaccharides que nous avons récoltés dans nos échantillons sont les sucres du 2YT ayant servi de milieu de culture pour les bactéries. Cela dit, dans le milieu 2YT utilisé ici, les sucres n'ont pas été consommés par des bactéries en culture. Cependant, si nous analysons les données de plus près, nous pouvons observer que ces extraits contiennent des pics avec un temps de rétention dans la colonne plus important que chacun de nos standards (voir flèches sur la figure 18). Nous ne savons donc pas à quoi correspondent ces pics et nous ne connaissons aucun standard présentant un temps d'éluion si important. Il est donc possible que ces pics correspondent à des monomères substitués (exemple : succinyl, pyruvyl, etc.).

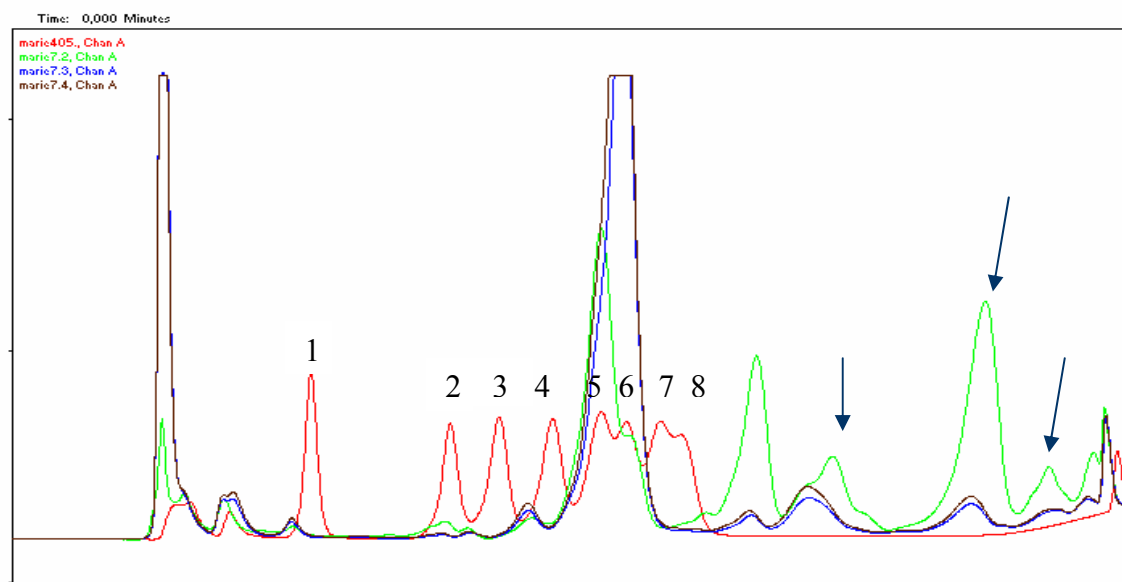


Figure 18 : Profil HPLC des échantillons 2YT (tracé vert), *B. melitensis* wt (tracé brun) et *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH (tracé bleu). Les pics rouges représentent les standards. 1 : fucose ; 2 : rhamnose ; 3 : arabinose ; 4 : glucosamine ; 5 : galactose ; 6 : glucose ; 7 : mannose ; 8 : xylose.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les souches *Brucella melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles *vjbR*-wt, *vjbR*-HTH ou *vjbR*-D82A agrègent en culture liquide. Pendant ce mémoire, nous nous sommes intéressés à ce phénotype : nous avons étudié la formation de ces agrégats et tenté de caractériser la ou les molécules responsables de ce phénotype.

A – Caractérisation du phénotype d'agrégation

1. Etude du phénotype d'agrégation chez *B. abortus*

Pour pouvoir agréger, les bactéries doivent obligatoirement modifier une structure de leur surface. Elles peuvent exprimer des structures d'attachement comme les capsules, les flagelles, les pili ou encore produire des substances adhésives comme les exopolysaccharides.

Brucella melitensis 16M possède un locus de 25 kb comportant essentiellement des gènes homologues à *A. tumefaciens* et *S. meliloti*, deux α -protéobactéries proches de *Brucella*. Chez ces deux espèces, ces gènes sont impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides. Il est donc possible que les gènes de ce locus codent aussi pour la synthèse d'exopolysaccharides chez *Brucella melitensis*.

B. abortus 2308, une autre espèce de *Brucella*, ne possède pas ce locus de 25 kb. Nous avons testé si les souches *B. abortus* sauvage, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée avec les allèles *vjbR*-wt, *vjbR*-HTH ou *vjbR*-D82A agrégeaient. Le résultat de cette expérience montre qu'aucune de ces souches n'agrège. Dès lors, nous soupçonnons l'implication du locus de 25 kb dans le phénotype d'agrégation. Etant donné que ce locus comporte essentiellement des gènes de biosynthèse d'exopolysaccharides, nous supposons que la molécule agglomérante est un exopolysaccharide.

2. Observation des agrégats en microscopie électronique à balayage

Pour tenter de visualiser la structure responsable de la formation des agrégats, nous avons observé les souches *B. melitensis* et *B. abortus* sauvages, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées avec les allèles *vjbR*-wt, *vjbR*-HTH, *vjbR*-D82A en microscopie électronique à balayage. Comme observé en culture 24 puits, ni *B. melitensis* sauvage ni les souches de *B. abortus* ne sont capables de former des agrégats. Nous confirmons donc les résultats précédents. Les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées forment comme attendu des agrégats. Ceux-ci semblent contenir une matrice englobant les bactéries, la présence de débris cellulaires, une augmentation de proportion des bactéries difformes et l'existence de trois types de filaments. Nos micrographies sont semblables à celles d'autres bactéries capables de former des biofilms. Pour rappel, un biofilm se compose de bactéries qui synthétisent une matrice protectrice. Celle-ci est composée de protéines, d'ADN, de bactéries lysées et surtout d'eau et d'exopolysaccharides. Le haut degré d'hydratation dans les biofilms donne un aspect gélatineux à la matrice.

Nous pensons que l'enveloppe observable localement autour des agrégats (figure 4C, 4D, 4E, 4H) est une matrice de biofilm. L'aspect gélatineux caractéristique de la matrice des biofilms n'a jamais été observé en microscopie électronique à balayage car cette matrice se rétracte suite au traitement nécessaire à la préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage. Comme ils sont majoritairement constitués d'eau, les biofilms sont déformés dès l'étape de déshydratation : la matrice est déshydratée et perd son aspect gélatineux en se rétractant. Le dépôt d'or a pour effet de solidifier l'échantillon, ce qui donne cet aspect friable de la matrice sur nos micrographies.

Nous observons également des débris cellulaires sur nos micrographies (figure 4J). Or, la lyse bactérienne est un phénomène courant au sein des biofilms. Il a été montré qu'une sous population de bactéries au sein d'une microcolonie se lyse pour fournir une ressource alimentaire

aux autres bactéries (Webb et al, 2003). De plus, ce processus permet de libérer de l'ADN dans la matrice du biofilm, ce qui augmente l'adhésion des bactéries entre elles. La présence de débris cellulaires dans nos échantillons fournit donc un deuxième argument quant à la formation d'un biofilm par les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées.

Nous avons également observé des bactéries difformes au sein des agrégats. Nous ne savons exactement pourquoi la proportion de ces bactéries augmente, mais nous pouvons émettre une hypothèse. Les souches capables de former des biofilms sont des souches ne possédant pas de régulateur VjbR fonctionnel, une dérégulation globale de tous les gènes cibles de VjbR a lieu. Dès lors, si le cycle cellulaire est régulé ne fût-ce que partiellement par VjbR, il est compréhensible que nous retrouvions une proportion de bactéries difformes plus importante. Nous pouvons imaginer que ces bactéries difformes soient des bactéries en cours de division, dans l'incapacité de donner deux bactéries filles.

Enfin, nous avons remarqué la présence de trois types de filaments au sein de nos agrégats. Nous ne connaissons pas leur nature, mais pouvons émettre quelques hypothèses. Le premier type de filament est de faible épaisseur et de courte taille (flèches de droite des figures 4K et 4L). Nous supposons qu'il s'agit de structures de surfaces adhérentes comme les fimbriae ou les pili. Le deuxième type de filament est fort différent : ils sont très longs, peu épais et semblent être adhésifs, voire gluants, puisque nous pouvons observer plusieurs bactéries y étant accrochées (figures 4E et 4F). Enfin, le troisième type de filament est épais et très long (flèches de gauche des figures 4K et 4L). Ces filaments semblent relier deux bactéries entre elles et les bactéries qui émettent ce type de filament forment un petit bourgeon à leur surface. A nouveau, nous n'avons pas d'idée quant à la nature exacte de ces fils, mais nous proposons qu'il puisse s'agir d'un exopolysaccharide comme de la cellulose, d'ADN ou d'une structure plus organisée.

- **ADN**

Ce dernier possède une propriété adhésive et constitue un composant typique des biofilms. Il pourrait être issu d'un mécanisme actif de sécrétion des bactéries ou provenir de la lyse bactérienne. La présence de débris cellulaires dans les agrégats coïncide avec cette hypothèse. Cependant, les acides nucléiques ne sont généralement qu'un composant minoritaire de la matrice des biofilms et vu l'abondance des fils dans les agrégats de *Brucella*, nous restons critiques face à cette hypothèse.

- **Cellulose**

Vu l'abondance et la cohésion apparente des fils, nous suspectons qu'ils puissent être de nature exopolysaccharidique. Toutes les bactéries capables de former des biofilms synthétisent un ou plusieurs exopolysaccharides matriciels et *Brucella* possède tous les gènes nécessaires pour médier la biosynthèse d'une telle molécule.

Il est décrit dans la littérature que la cellulose peut être un composant des biofilms qui est produit fréquemment par les bactéries. Ainsi, la bactérie pathogène *Agrobacterium tumefaciens* synthétise des fibrilles de cellulose pour adhérer aux cellules végétales hôtes (Matthysse et al, 1981). En observant ces fibrilles de cellulose, il nous a semblé qu'elles ressemblaient aux fils présents dans les agrégats de nos micrographies (figure 1). Bien qu'elle ne soit pas une bactérie pathogène de végétaux, *Brucella* est une α -protéobactérie phylogénétiquement proche d'*A. tumefaciens*. *Brucella* possède de nombreux gènes homologues à ceux de ce pathogène végétal dont un gène codant pour une cellulose synthétase. L'organisation du locus contenant ce gène est d'ailleurs extrêmement bien conservée entre les deux bactéries. Il ne serait donc pas impossible que *Brucella* synthétise de la cellulose et il se pourrait que les filaments que nous avons observés dans les biofilms soient des fibrilles de cellulose.

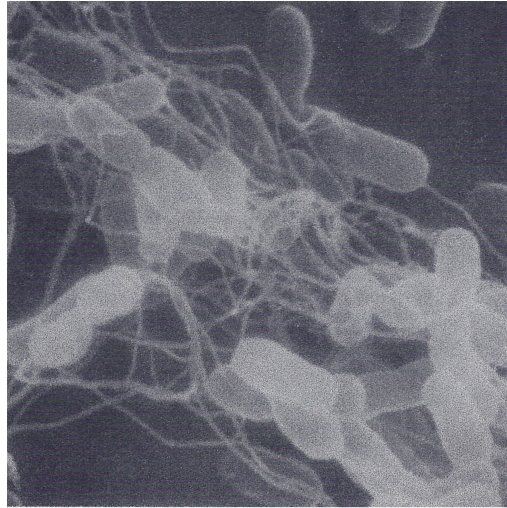


Figure 1 : Aperçu des fibrilles de cellulose produites par les bactéries *A. tumefaciens* pour s'attacher aux cellules végétales
Reproduit de : Matthyse et al, 1981

- **L'étrange ressemblance avec l'appendice d'*Hyphomonas adhaerens*...**

Les bactéries du genre *Hyphomonas* ont une division asymétrique : une bactérie produit un appendice particulier appelé prosthecum (flèche gauche de la figure 2) à l'un de ses deux pôles qui mature et donne naissance à une bactérie flagellée. La bactérie flagellée se détache alors de l'appendice et se disperse dans la nature. La bactérie qui a gardé le prosthecum peut continuer à se diviser tandis que la bactérie flagellée doit d'abord perdre son flagelle et synthétiser un prosthecum pour pouvoir se reproduire (Zerfas et al, 1996). Cet appendice est fort semblable à ce que nous avons observé chez *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles de *vjbR* (voir figure 2).

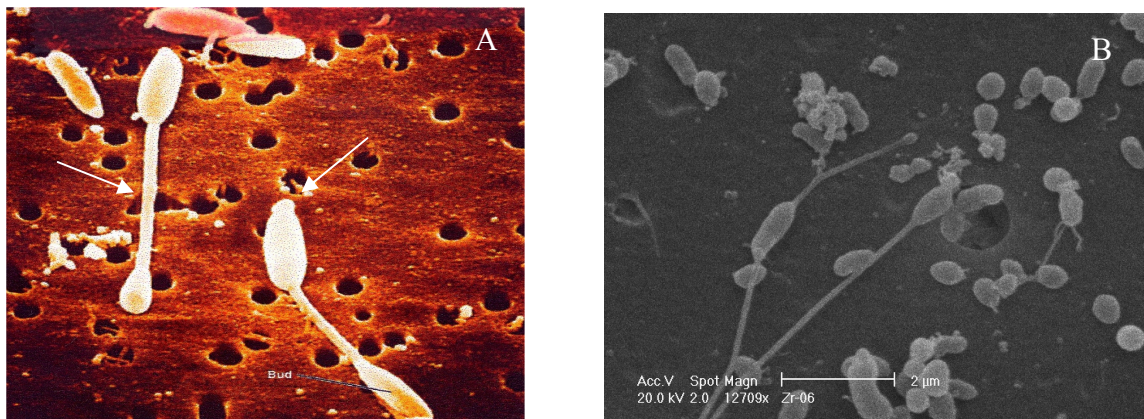


Figure 2 : Comparaison du phénotype des bactéries *Hyphomonas adhaerens* en cours de division (figure 2A) et des souches de *B. melitensis* agglomérantes (figure 2B). Chez *Hyphomonas*, la bactérie mère synthétise un appendice (flèche de gauche) qui donne naissance à une bactérie fille flagellée. A ce stade du cycle cellulaire, un polysaccharide capsulaire englobe complètement les bactéries.

Chez *Brucella*, on s'aperçoit également que ces appendices relient toujours deux bactéries entre elles. De plus, les bactéries *Hyphomonas* présentent également un bourgeonnement au niveau de leur surface lorsqu'elles produisent ce prosthecum (figure 2, flèche de droite). Cette curieuse ressemblance entre les phénotypes de ces deux bactéries nous laisse penser que *Brucella*

puisse produire cet appendice lors de son cycle cellulaire. De plus, toutes les bactéries produisant des prosthécum appartiennent à la classe des α -protéobactéries.

3. Conclusion

Grâce à l'étude microscopique que nous avons menée, nous pouvons suggérer que les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées produisent tous les éléments nécessaires à la formation d'un biofilm. Nous avons observé une matrice englobant une foule de bactéries, des débris cellulaires et des fils adhésifs de nature inconnue. De plus, *B. melitensis* possède un locus de 25 kb qui comporte des gènes que l'on suspecte être impliqués dans la synthèse d'un exopolysaccharide. Ce locus est absent chez *B. abortus*, une autre espèce de *Brucella*, incapable d'agréger dans nos conditions de culture. Nous soupçonnons que ce locus code pour la synthèse d'un exopolysaccharide, responsable au moins en partie de la formation des « biofilms » que nous avons observés.

4. Perspectives

Afin de mieux visualiser la matrice englobant les bactéries au sein des agrégats, il serait intéressant d'observer ces agrégats en microscopie électronique à transmission. De plus, nous pourrions tenter de marquer spécifiquement certains composants du biofilm à l'aide d'anticorps couplés à des billes d'or calibrées et observer au microscope électronique à transmission la présence ou l'absence du marquage. Par exemple, nous pourrions envisager de déterminer la nature exacte des filaments rencontrés à plusieurs reprises dans les biofilms en utilisant des anticorps anti-protéine flagellaire ou des lectines.

Pour savoir si la cellulose est impliquée dans la formation des biofilms, nous pourrions incuber les agrégats en présence de cellulase, l'enzyme dégradant la cellulose. Si la cellulose est la substance qui permet d'agréger les *Brucella*, alors les agrégats seront détruits par la cellulase. Nous pourrions aussi construire et analyser une souche mutante pour le gène de la cellulose synthétase.

Dans ce mémoire, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'un exopolysaccharide dans les agrégats formés par les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles de *vjbR*.

B – Etude des exopolysaccharides impliqués dans le phénotype d'agrégation

1. Mise en évidence de la présence d'exopolysaccharides

Pour mettre en évidence l'exopolysaccharide impliqué dans la formation des agrégats, nous avons réalisé différents marquages à l'aide de différents colorants. Nous avons utilisé le calcofluor, le rouge congo et le cristal violet, trois marqueurs spécifiques de polysaccharides. Ensuite, nous avons tenté de visualiser la matrice polysaccharidique des biofilms grâce à l'utilisation de la concanavale A-FITC, une lectine couplée à un fluorochrome émettant dans le vert.

- **Marquages au rouge congo**

Le rouge congo se lie aux unités (1-4)- β -D-glucopyranosyl. Nous avons testé la fixation de ce colorant par les souches *B. melitensis* sauvage, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les différents allèles de *vjbR* ainsi que par le pMR10 vide et les mêmes souches chez *B. abortus*. La fixation a été testée en milieu liquide et solide. Toutes les souches fixent le rouge congo en milieu solide. Ceci signifie que toutes ces bactéries présentent à leur surface un polysaccharide (du LPS ou un exopolysaccharide) reconnu par le rouge congo. Par ailleurs, comme contrôle, nous avons choisi une souche de *B. melitensis* 16M dépourvue de chaîne O du LPS. Ce contrôle fixe également le

rouge congo, ce qui signifie que ce colorant se fixe aussi sur un polysaccharide différent du LPS. Nous pourrions proposer que les souches de *B. abortus* et *B. melitensis* sauvage synthétisent l'exopolysaccharide à un taux basal et que les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles mutés de *vjbR* surproduisent cet exopolysaccharide. Néanmoins, si nous considérons que les gènes nécessaires à la production de cet exopolysaccharide font partie du locus de 25 kb, alors nous ne pouvons pas justifier la couleur rouge des souches de *B. abortus* par la production basale d'un exopolysaccharide. Dans ce cas, nous pourrions suggérer une autre explication quant à la couleur rouge des colonies de *B. abortus*. Il est décrit que la cellulose fixe le rouge congo et nous savons que *B. abortus* et *B. melitensis* possèdent une cellulose synthétase. Nous pouvons donc imaginer que *B. abortus* et *B. melitensis* soient capable d'assurer une production basale de cellulose ce qui expliquerait pourquoi les colonies formées par ces souches sont rouges et que cette production est dérégulée chez les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles mutés de *vjbR*.

- **Marquages au calcofluor**

Le calcofluor est un marqueur des polysaccharides β -D-glucan et des liaisons β -1-3 et β -1,4. Nous avons testé la fixation de ce colorant par les souches *B. melitensis* sauvage, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les différents allèles de *vjbR* ainsi que par le pMR10 vide et les mêmes souches chez *B. abortus*.

L'addition de calcofluor aux cultures liquides nous a permis de mettre en évidence un marquage bleu diffus caractéristique chez les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les allèles mutés de *vjbR* et par le pMR10 vide. Comme ce marquage diffus est typique d'un marquage des polysaccharides matriciels des biofilms, nous en inférons que ces souches produisent un exopolysaccharide. Comme le calcofluor marque la cellulose, il pourrait s'agir de cellulose. De plus, lors du double marquage calcofluor/iodure de propidium, nous avons observé des fils d'ADN marqués par l'iodure de propidium au sein des agrégats. Une fois de plus, l'ADN étant un constituant fréquent de la matrice des biofilms, cette observation suggère également que *Brucella melitensis* soit capable de former des biofilms. Cet ADN semble provenir de la lyse bactérienne, puisque nous avons comptabilisé 30% de bactéries mortes dans ces biofilms à l'aide du test de viabilité. Ces résultats concordent donc avec les résultats obtenus précédemment.

- **Marquages au cristal violet**

Le cristal violet est un colorant utilisé pour déterminer la présence ou l'absence de la chaîne O du LPS des bactéries. Nous avons mis ce colorant en présence des souches *B. melitensis* sauvage, $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les différents allèles de *vjbR* ainsi que par le pMR10 vide et les mêmes souches chez *B. abortus*. Le marquage a été réalisé en milieu liquide et solide. En milieu solide, nous avons observé que les souches *B. melitensis* et *B. abortus* sauvages et $\Delta vjbR$ sont blanches, ce qui signifie qu'elles ne fixent pas le cristal violet et qu'elles possèdent du LPS. Toutes les autres souches sont violettes, ce qui sous-entend que ces souches sont soit dépourvues de LPS ou qu'elles synthétisent un exopolysaccharide. Les souches *B. abortus* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les différents allèles de *vjbR* et par le pMR10 vide étant violettes, mais ne formant pas d'agrégats, nous supposons que ces souches synthétisent un exopolysaccharide à un taux basal et que les souches capables d'agréger surexpriment cette même substance. Comme nous avons vérifié par western-blot que ces souches avaient un LPS normal, nous supposons que le marquage violet de ces souches est dû au fait que ces bactéries produisent un exopolysaccharide. A nouveau, il serait possible que cet EPS soit de la cellulose, puisque une souche qui produit ce polymère apparaît violette en présence de cristal violet.

- **Marquages à la concanavaleine A-FITC**

Après avoir réalisé tous ces marquages, nous avons tenté de visualiser la matrice de ces biofilms grâce à la lectine concanavaleine A couplée au fluorochrome FITC. Nous avons

également marqué les bactéries à l'iodure de propidium. Nous avons obtenu un marquage caractéristique des biofilms, à savoir des bactéries implantées dans une matrice. Etant donné que cette matrice est marquée par la concanavaline A, nous pouvons affirmer qu'elle contient des exopolysaccharides. Au sein de cette matrice, nous rencontrons des zones riches en bactéries alors qu'à certains endroits la densité de la population est plus faible. Les zones denses pourraient correspondre aux microcolonies des biofilms. Nous rencontrons également des fils d'ADN, faisant partie intégrante du biofilm ou provenant de la mort bactérienne induite par la fixation des bactéries à la PFA. Cela dit, nous n'observons pas de fils semblables chez la souche sauvage qui a pourtant subi le même traitement. Enfin, nous observons également des zones noires, non marquées par la concanavaline A-FITC ou l'iodure de propidium. Si l'on se projette dans un biofilm, ces zones pourraient correspondre à des canaux aqueux parcourant l'ensemble du biofilm dans le but d'apporter les nutriments aux bactéries et d'évacuer leurs déchets métaboliques.

2. Mutagenèse par intégration disruptive de trois gènes du locus de 25 kb

Pour étudier l'implication du locus de 25 kb dans la synthèse d'un exopolysaccharide qui interviendrait dans la formation des biofilms de *Brucella melitensis*, nous avons disrupté trois gènes de ce locus. Nous avons choisi de disrupter deux gènes intervenant à des moments très différents dans la voie de biosynthèse de l'exopolysaccharide : *exoA* code pour une enzyme qui intervient dans la deuxième étape de la voie de biosynthèse tandis que *exoT* code pour une enzyme permettant d'exporter l'exopolysaccharide néosynthétisé. Comme il a déjà été décrit chez plusieurs espèces bactériennes que les protéines de membrane externe (Omp) pouvaient intervenir dans l'export d'exopolysaccharides, nous avons aussi disrupté *omp31*, qui code pour l'Omp31. Nous n'avons pas pu vérifier le génotype de ces souches par southern blot ou par PCR dans les délais du mémoire, mais nous avons tout de même observé leur phénotype en culture ainsi que leur coloration en présence de crystal violet.

Nous avons observé que les trois souches résultantes, à savoir *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$, *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoT$ et *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$, sont encore capables d'agrégier. Néanmoins, le double mutant *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$ ne forme que de petits agrégats et ce à partir de 24 heures de culture. A ce temps de culture, les autres souches disruptantes forment des agrégats plus conséquents. En présence de cristal violet, les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta omp31$ et *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$ restent blanches, alors que la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$ était violette. Ceci suggère que ces deux souches disruptantes sont devenues incapables de synthétiser leur exopolysaccharide. Sous réserve de la validation du génotype des doubles mutants, nous en déduisons que les gènes *exoA* et *omp31* interviennent dans la voie de biosynthèse de l'exopolysaccharide. Comme la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR/\Delta exoA$ est encore capable d'agrégier, nous proposons que la formation des biofilms soit due à deux exopolysaccharides : l'un encodé par le locus de 25 kb, l'autre par la cellulose synthétase. Le gène *exoT*, quant à lui, ne semble pas indispensable à la formation des biofilms de *Brucella*.

3. Extraction des exopolysaccharides de *Brucella melitensis* 16M

Dans l'espoir de pouvoir caractériser l'exopolysaccharide impliqué dans la formation des biofilms, nous avons tenté d'extraire celui-ci à partir d'une culture de *Brucella*. Le protocole que nous avons appliqué était imparfait, puisque l'analyse en HPLC nous montre que les seuls polysaccharides que nous sommes parvenus à isoler sont présents également dans le milieu 2YT. De plus, une analyse par dot blots nous a montré que cette méthode d'extraction isole aspécifiquement tous les polysaccharides du milieu, y compris le LPS. Néanmoins, ces dot-blots nous ont permis de tirer quelques conclusions : nous observons que la préparation de *B. melitensis* sauvage contient plus de LPS que la préparation de *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH. Les échantillons étant à même concentration de sucres, nous en déduisons que la préparation de *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH doit contenir un autre polysaccharide. De

plus, cette préparation contient plus d'Omp25, Omp31 et Omp36 que l'échantillon de la souche sauvage. Ce résultat a été confirmé par des dot blots réalisés sur des échantillons remis à même concentration protéique. Ceci laisse penser que la souche *B. melitensis* $\Delta vjbR$ + pMR10 HTH a sa membrane altérée et nous proposons que ces trois protéines de membrane soient des nouvelles cibles de VjbR.

4. Conclusion

Grâce aux études microscopiques et colorimétriques que nous avons menées, nous avons mis en évidence la production d'exopolysaccharides par les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les différents allèles de *vjbR*. Nous avons montré que ce phénotype est dû au moins en partie à la production d'un exopolysaccharide. Les souches de *B. abortus* et *B. melitensis* sauvage auraient une capacité d'adhérence basale assurée par la production d'un taux basal d'exopolysaccharide (cellulose ou autre). Les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentée par les différents allèles de *vjbR* étant dérégulées, ces bactéries surproduisent l'exopolysaccharide et leur capacité à adhérer est donc accrue.

Les bactéries semblent s'adapter à la vie en laboratoire en modifiant leur génome. Or, la plupart des bactéries forment des biofilms pour se protéger de divers stress ou simplement pour adhérer aux surfaces, *in vivo*. Lorsqu'elles se retrouvent *in vitro*, peu de stress les menacent et cessent donc préférentiellement d'exprimer les gènes impliqués dans la formation des biofilms. Il est donc capital de trouver des conditions de culture stimulant la formation de biofilms chez *Brucella*. Ceci nous permettrait d'obtenir de plus gros biofilms, qui augmenteraient le contraste qui existe entre les souches agglomérantes et les souches *B. abortus* et *B. melitensis* sauvage.

5. Hypothèses quant à la fonction des biofilms formés par *Brucella melitensis* 16M

Après avoir démontré que *Brucella* est capable de synthétiser des exopolysaccharides, il nous reste à trouver les conditions induisant la formation de biofilms dans la souche *B. melitensis* sauvage et comprendre la fonction de ceux-ci. Avant cela, nous pouvons d'ores et déjà discuter de la fonction que pourrait assurer un biofilm chez *Brucella melitensis* 16M.

B. melitensis 16M est une bactérie pathogène facultative intracellulaire. Cette bactérie voyage donc entre son hôte et son milieu naturel. Dans chacun de ces deux environnements, les biofilms peuvent avoir une fonction d'attachement ou de protection. Analysons une à une les quatre possibilités que nous envisageons : rôle protecteur en milieu naturel ; rôle d'attachement dans le milieu naturel ; rôle protecteur chez l'hôte et enfin rôle d'adhérence chez l'hôte.

- **Le rôle protecteur des biofilms dans le milieu naturel**

Contrairement à la vie en laboratoire où les bactéries ont tout « à portée de main » (nutriments essentiels, oxygène, eau, température idéale, absence de concurrence, etc.), la vie dans leur environnement naturel est une véritable lutte. Nous pouvons donc imaginer que *Brucella* forme des biofilms pour faire face à toutes les menaces de son milieu naturel. Il a souvent été montré que les bactéries forment des biofilms pour résister à tous les stress de l'environnement et il est possible que *Brucella* puisse faire pareil.

- **Le rôle d'attachement des biofilms dans le milieu naturel**

Dans leur milieu naturel, la plupart des bactéries vivent attachées à une surface le plus souvent en formant des biofilms. En plus d'offrir une protection contre les stress du milieu, l'adhérence aux surfaces peut être nécessaire à la colonisation d'une niche. Dans ces conditions, les bactéries doivent être capables de s'attacher à une surface (a)biotique pour pouvoir s'établir dans leur niche.

- **Le rôle protecteur des biofilms dans l'organisme hôte**

Comme toute bactérie intracellulaire, *Brucella* passe forcément par une phase extracellulaire. Dès lors, nous pouvons imaginer que *Brucella* forme un biofilm pour se protéger des défenses immunitaires de son hôte. Il a été montré que la bactérie *Burkholderia pseudomallei* produit une capsule polysaccharidique qui réduit la fixation de la protéine C3b du complément. Il en résulte une diminution de l'opsonisation et donc un taux accru de survie de ces bactéries (Reckseidler-Zenteno et al, 2004). Il se pourrait que *Brucella* produise un biofilm qui a un rôle de protection similaire, à savoir la protection face au système du complément.

La dernière possibilité que nous envisageons est la production d'exopolysaccharides par les bactéries dans les phagocytes. Après internalisation de la bactérie, ces phagocytes déversent de nombreux radicaux libres, comme la peroxyde d'hydrogène, dans le but d'exterminer celle-ci. Nous pouvons donc imaginer que la synthèse d'exopolysaccharides par les bactéries phagocytées leur permet de résister au pH intracellulaire et aux radicaux libres produits par les phagocytes.

- **Le rôle d'attachement des biofilms dans l'organisme hôte**

Certains phénotypes bactériens sont liés à leur pathogénie. Ces phénotypes incluent leur capacité à reconnaître et à s'attacher aux cellules hôtes, leur aptitude à pénétrer ces cellules eucaryotes, leur capacité à s'agréger et la formation de leur biofilm. L'aggrégation est un mécanisme de virulence répandu dans le monde procaryote. Vu la capacité qu'ont les *Brucella* à adhérer, nous pensons que les biofilms de ces bactéries puissent les aider à se fixer à leurs cellules hôtes (des cellulaires phagocytaires professionnelles ou non, en l'occurrence) (Sherlock et al, 2005).

Enfin, lorsqu'elle est responsable d'infections chroniques, *Brucella* peut induire une endocardite. Or, il a été montré que certaines endocardites sont liées à la formation de biofilms par des bactéries persistantes (Donlan & Costerton, 2002). Cette pathologie est due à l'adhésion des bactéries circulantes à l'endothélium des vaisseaux sanguins irriguant les valvules cardiaques. Normalement, les bactéries adhèrent faiblement à cet endothélium, mais lorsqu'il est endommagé, il synthétise de la fibronectine, molécule capable de se lier aux bactéries qui favorise leur adhésion.

6. Perspectives

Tout d'abord, nous devons trouver des conditions dans lesquelles *B. melitensis* agrège ou dans lesquelles les souches *B. melitensis* $\Delta vjbR$ et $\Delta vjbR$ complémentées par les allèles mutés de *vjbR* forment des biofilms plus importants.

Face à tous les inconvénients du protocole d'extraction des exopolysaccharides de *Brucella*, nous pourrions mettre au point une nouvelle méthode d'extraction. Dans le protocole que nous avons appliqué, nous inactivons les bactéries à 100°C, température altérant les bactéries. Ces bactéries libèrent alors leurs constituants dont des polysaccharides dans le milieu. Ces sucres se mélangent avec les exopolysaccharides et se retrouvent dans l'échantillon final. Il en va de même pour les polysaccharides du milieu 2YT. Dans le nouveau protocole, nous devrionsensemencer les bactéries dans un milieu sans polysaccharides. Puis, après culture, récupérer le surnageant contenant les exopolysaccharides et l'inactiver à 80°C. Un milieu de composition bien définie comme la RPMI permettrait d'obtenir ces conditions. De cette manière, nous ne serions plus contaminés par les polysaccharides du milieu de culture.

Pour améliorer la méthode de dosage des sucres, nous pourrions adopter la méthode de dosage des sucres totaux à l'antrone. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H₂SO₄) à chaud. Les dérivés furfuraliques obtenus (5-hydroxyméthyl-furfural pour les hexoses) se condensent avec l'antrone pour donner des produits colorés. Les différences de couleur obtenues (bleu-vert avec les hexoses, rouge avec les

pentoses) donnent une certaine spécificité à la technique. La méthode est réputée pour son excellente sensibilité.

Pour décontaminer les échantillons obtenus des traces de LPS et de blebs, nous suggérons un protocole d'extraction au phénol, habituellement utilisé pour purifier du LPS. Avec ce nouveau protocole, nous espérons pouvoir isoler suffisamment d'exopolysaccharide (10 mg) pour pouvoir le caractériser par résonance magnétique nucléaire en collaboration avec un laboratoire suédois.

Afin de déterminer quels sont les gènes qui codent pour la synthèse de cet exopolysaccharide, nous pourrions étendre l'étude de mutagenèse par intégration disruptive à tous les gènes du locus de 25 kb. Comme il s'agit probablement d'un ensemble de gènes qui régissent la biosynthèse de cet exopolysaccharide, cette approche ne sera probablement pas suffisante.

Nous pourrions également étudier l'activité des promoteurs de chaque gène de ce locus et étendre cette étude à d'autres gènes pouvant être impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides. En effet, outre ce locus de 25 kb, d'autres gènes du génome de *Brucella* seraient impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides (la cellulose synthétase par exemple). Enfin, pour savoir si la présence de ce locus est capable d'induire à elle seule la formation de biofilms, nous pourrions tenter d'insérer ce locus de 25kb chez *B. abortus*. Si cette bactérie formait des biofilms, alors nous pourrions dire que l'expression de ce phénotype n'est due qu'à la portion de gènes comprise dans le locus de 25 kb.

Pour approfondir notre perception de la nature d'autres monosaccharides qui composent l'exopolysaccharide, nous pourrions utiliser d'autres lectines que la concanavaline A couplées à un fluorochrome.

Puisque la formation des agrégats est un phénomène transitoire dépendant de la phase de culture, un système de régulation complexe doit être impliqué. Nous pouvons bien sûr émettre l'hypothèse d'une régulation dépendante de la densité par le QS, mais d'autres régulateurs sont certainement impliqués. Ainsi, il a été montré au laboratoire qu'un mutant du gène *prlS* agrège (R-M Delrue, communication personnelle). Ce gène code pour la protéine PrlS, faisant partie d'un système à deux composants (PrlR, PrlS), homologue à VrsB et VrsC, le système à deux composants chez *Ralstonia solanacearum*. Chez cette bactérie, ce système régule la synthèse d'exopolysaccharides. La formation d'un biofilm étant un processus complexe, d'autres régulateurs sont probablement impliqués dans le contrôle de la formation de ce phénotype. C'est pourquoi, le crible d'une banque de mutants transpositionnels chez *Brucella* pourraient nous révéler d'autres régulateurs du phénotype d'agrégation.

Pour inférer la fonction des biofilms de *Brucella*, nous pourrions tester la résistance des souches agglomérantes à différents stress physiques, chimiques (comme le pH, le peroxyde d'hydrogène ou biologiques (comme la fixation du complément).

Nous pourrions également envisager de travailler sur une souche de terrain, qui n'a pas encore été passée *in vitro*, parce que les bactéries subissant de nombreux passages en culture s'adaptent à la vie en laboratoire et perdent les gènes qui leur sont inutiles pour pouvoir se multiplier plus rapidement *in vitro* (Shirtliff et al, 2005). Il a en effet été décrit que les gènes préférentiellement perdus sont ceux responsables de la virulence ainsi que les gènes impliqués dans la formation des biofilms (Shirtliff et al, 2005).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

1.1 Solutions et milieux

1.1.1 Solutions d'antibiotiques et autres (tableau 1)

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale
Acide nalidixique (Nal)	NaOH 0, 2 N	25 mg/ml	25 µg/ml
Ampiciline (Amp)	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chlorempénicol (Cm)	éthanol 100%	20 mg/ml	20 µg/ml
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside (IPTG)	H ₂ O	1 M	1 mM
Kanamycine (Kan)	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Nourséothricine (Nou)	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycine (Sm)	H ₂ O	10 mg/ml	10 µg/ml
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)	diméthylformamide	20 mg/ml	20 µg/ml
C ₄ -HSL (Fluka)	acétonitrile	10 mM	5 µm
C ₈ -HSL (Fluka)	acétonitrile	10 mM	5 µm
C ₁₂ -HSL (Fluka)	acétonitrile	10 mM	5 µm
Calcofluor pH= 8, 8 (milieu solide)	H ₂ O + NaOH	1 mg/ml	0, 2 mg/ml
Rouge Congo (milieu liquide)	H ₂ O	-	0, 01%
Cristal violet	H ₂ O	0,05%	0, 05%

Tableau 1 : Solutions d'antibiotiques et autres utilisées durant ce mémoire

1.1.2 Milieux de culture

1.1.2.1. Milieu riche pour *E. coli* : milieu LB (Luria Bertani)

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide (agar)
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

1.1.2.2 Milieu riche pour *Brucella* : milieu 2YT

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide (agar)
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	1 g

Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C. Le milieu est refroidi à environ 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

Les additifs utilisés sont le calcofluor pH 8.8 0, 2 mg/ml ou le rouge congo 0, 005%.

1.2 Souches bactériennes et plasmides (tableau 2)

Souche / plasmide	Caractéristiques	Utilisation	référence/origine
Souches			
<i>E. coli</i> :			
- DH10B	<i>F⁻, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80dlacZΔlacX74, endA1, recA1, deoR Δ(ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL λ-</i>	Transformation de divers plasmides et produits de ligation.	Gibco BRL
- S17	<i>recA, thi pro hsdR-M⁺, RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7</i> lysogénisée avec le phage λpir, Sm ^R , Sp ^R , Tp ^R .	Bactérie donneuse pour conjugaison.	Simon, 1983
<i>Brucella</i> :			
- <i>melitensis</i> 16M	Souche sauvage, virulente, Nal ^R , smooth LPS	ce mémoire	A. Macmillan, isolée sur le terrain en 1955.
- <i>melitensis</i> 16M Δ <i>vjbR</i>	Souche mutante knock out Kan ^R dans le gène BMEI1116	ce mémoire	Delrue, Deschamps, 2005
- <i>abortus</i> 2308	Souche sauvage, virulente, smooth LPS, Nal ^R	ce mémoire	Sangari, 1991.
- <i>abortus</i> 2308 Δ <i>vjbR</i>	Souche mutante knock out Kan ^R dans le gène BMEI1116	ce mémoire	Deschamps, 2005
Plasmides			
pMR10 <i>cat</i> gateway	Origine de réplication RK2oriV, Kan ^R , Chl ^R , dérivé du pMR10 mCS1	Plasmide réplicatif chez <i>Brucella</i> à faible nombre de copie	R. Hallez, thèse en cours
pSKoriT-Chl	Origine de transfert et origine de réplication ColE1 (origine non fonctionnelle chez <i>Brucella</i>), Chl ^R	Plasmide non réplicatif (intégratif) chez <i>Brucella</i>	Tibor et al, 2002
pF6 <i>nat</i>	Origine de réplication, Amp ^R , Nou ^R	Plasmide réplicatif	Don de Hentges, 2005 (article soumis)

Tableau 2 : Souches bactériennes et plasmides utilisées dans le cadre de ce mémoire.

II. Méthodes

2.1 Techniques de biologie moléculaire

2.1.1. Extraction d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides produits par des bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension. Les tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez *E. coli* sont référencés dans le tableau 3. Le protocole, quant à lui, est disponible dans le manuel « Plasmid DNA purification » de Macherey-Nagel ainsi qu'en annexe.

2.1.2. Restriction d'ADN plasmidique purifié

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique : elles reconnaissent des sites de restrictions, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 8 paires de bases. La coupure peut former des "bouts protrudants" ou générer des bouts francs. La ligation d'un bout protrudant n'est possible qu'avec un bout protrudant complémentaire. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs (tableau 4).

Pour cela, on mélange dans un eppendorf

- 1 µl d'ADN plasmidique purifié.
- 1 µl d'enzyme de restriction.
 - 2 µl de tampon de restriction 10X
 - Porter le volume à 20 µl avec de l'H₂O distillée stérile.
- Incubation d'une heure à 37°C. La température peut cependant varier en fonction de l'enzyme utilisée.

L'ADN restreint est ensuite séparé selon la taille des fragments par une électrophorèse en gel d'agarose. Pour cela, il faut ajouter un dixième du volume de dépôt de tampon de dépôt d'électrophorèse au produit de restriction et déposer sur gel d'agarose.

2.1.3. Filling

On réalise un filling lorsqu'on utilise une stratégie de clonage à bouts francs et que l'un des deux fragments à liguer est protrudant et l'autre est franc. Cette étape permet de prolonger l'extrémité 3' du fragment protrudant, grâce à la T4 polymérase de *E. coli* et ainsi le rendre franc. Cette enzyme se sert du brin d'ADN complémentaire pour compléter l'extrémité 3'. Pour éviter le rognage de l'extrémité 5' par l'enzyme, les dNTP sont mis en excès.

Pour cela, on mélange dans un eppendorf :

- 4 µl de dNTP
- 350 ng d'ADN
- 8 µl de tampon 5X
- 2 µl de T4 polymérase

On complète avec de l'eau pour obtenir un volume final de 40 µl et on incube d'abord une heure à 37°C pour le filling (on augmente la proportion de ponts Hydrogènes à basse température) et ensuite 15 minutes à 65°C pour inactiver l'enzyme.

2.1.4. Ligation

On utilise l'ADN ligase du phage T4 pour lier de manière covalente des fragments d'ADN. Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une autre extrémité. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Dans un eppendorf, placer un mélange de deux fragments à liguer dans un rapport moléculaire vecteur et insert de 1/3. Ajouter 1 µl de DNA ligase T4 (Invitrogen) ainsi que 1/10^{ème} du volume total de ligation de tampon de ligation 10X.

Compléter avec de l'eau distillée stérile et incuber à 16°C pendant 16 heures si les extrémités sont à bouts francs ou quelques heures à 25°C si les extrémités sont protrudantes.

2.1.5 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Les fragments sont visualisés grâce au bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est ainsi visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

• Méthode :

- Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 0,8 g d'agarose (Molecular Biology Grade) dans 80 ml de tampon TAE 1X.
- Porter à ébullition. Quand la solution est tiède, couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter 2 µl de bromure d'éthidium (0,1 µg / ml) avant la polymérisation du gel.
- Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE1 X (tableau 5).

- Déposer les échantillons additionnés de $1/10^{\text{ème}}$ de tampon de dépôt 10X (tableau 5) dans les puits.
- La différence de potentiel appliquée est d'environ 100 V, l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive.
- Visualiser l'ADN sous UV.

- **Marqueurs de tailles pour gel d'agarose :**

En parallèle des échantillons, on fait migrer 5 µl de marqueur de poids moléculaire afin de déterminer la taille du ou des fragments présents dans les échantillons. Le marqueur utilisé est l'Hyperladder I (Bioline) (figure 1).

2.1.6 Purification sur gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN en gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse, principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. Nous avons utilisé le Kit MBI Fermentas. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silice auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés. Le protocole provient du "DNA Extraction Kit" de MBI Fermentas et est repris en annexe.

2.1.7 Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires à la séquence se trouvant de chaque côté de la région cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. La longueur de la séquence cible est déterminée par la distance entre les deux amorces. Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce. Nous avons utilisé la *Taq* DNA Polymérase (Biotools) pour les PCR diagnostiques et la Expand High Fidelity (Roche) pour les clonages.

Un cycle PCR comprend 3 étapes:

- La dénaturation, à 95°C, permet de séparer les deux brins d'ADN.
 - L'hybridation des amorces s'effectue à une température dépendante de la température de melting des amorces utilisées, c'est-à-dire entre 50 et 72°C.
 - L'élongation, à 72 °C, permet la polymérisation des brins par la polymérase.
- En répétant ce cycle une trentaine de fois, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la région cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting T_m des amorces. Celui-ci se calcule de la façon suivante: $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. Les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible.

Il est également recommandé, de façon à limiter les amplifications non spécifiques, que l'amorce contienne un excès de G-C à l'extrémité et au centre et que les trois dernières bases de l'extrémité 3' soient riches en A/T. Les ponts hydrogènes formés par ces bases étant au nombre de deux, la liaison est moins forte et permet une hybridation de l'enzyme plus aisée.

- **Méthode :**

Le mélange de réaction est réalisé dans un Eppendorf pour PCR:

Réactifs	Quantité
ADN portant la région à amplifier (matrice)	~20 ng
Tampon 10X correspondant à la polymérase	5 µl
Mélange dNTP's (5 mM pour chaque)	4 µl
Primer 1 (10 µM) (tableau 6)	1 µl
Primer 2 (10 µM) (tableau 6)	1 µl
Taq polymérase ou High Fidelity	0,5 µl
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl

Pour vérifier l'amplification du fragment cible, 1/10^{ème} de la réaction PCR est déposée sur gel d'agarose.

- **Témoin négatif :**

La PCR est réalisée sans ADN à amplifier, cela permet de vérifier que les composés nécessaires à la réaction ne sont pas contaminés par de l'ADN étranger.

- **PCR sur colonies :**

Cette méthode permet de rechercher la présence d'un fragment d'intérêt après une étape de transformation. Une partie de la colonie est additionnée au mélange PCR et sert de matrice.

2.1.8 La conjugaison bactérienne

La conjugaison entre bactéries à Gram négatif est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries, via un pili sexuel. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif. Le plasmide d'intérêt doit quant à lui contenir une origine de transfert (oriT).

- **Méthode :**

- Préparer deux précultures :
ensemencer, d'une part, 10 ml de LB liquide avec des *E. coli* S17 (RP4+) donneuses contenant le plasmide d'intérêt. D'autre part, ensemencer 10 ml de 2YT liquide avec une colonie de *Brucella* receveuse (Nal^R).
- Incuber les deux précultures durant une nuit à 37°C sous agitation.
- Le jour de la conjugaison, ensemencer 9 ml de LB liquide frais avec 1 ml de la préculture de *E. coli* S17 de manière à ce que les bactéries se trouvent dans la phase exponentielle de croissance quelques heures après (3-4 heures environ).
- Avant la conjugaison, centrifuger les cultures de *E. coli* S17 et de *Brucella* pendant 20 minutes à 3500 rpm afin de culotter les bactéries. Eliminer au maximum les surnageants afin d'éliminer toute trace d'antibiotiques.
- Resuspendre dans un volume final de 1 ml de 2YT.
- Placer un filtre stérile 0,22 µm sur une boîte de pétri bien sèche de 2YT sans antibiotique. Y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E. coli* S17.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre à l'aide d'une anse en plastique.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.

- Transférer le filtre dans une boîte de Pétri vide. Y déposer 1 ml de 2YT et récupérer les bactéries à l'aide d'une anse en plastique en grattant délicatement la surface du filtre.
- Récupérer le milieu enrichi en bactéries dans un eppendorf.
- Effectuer une dilution 10 et 100 fois pour un plasmide à faible copie (1000 fois pour un plasmide à copie moyenne).
- Etaler 150 µl de chaque suspension bactérienne sur un milieu 2YT sélectif (acide nalidixique + marqueur du plasmide). L'acide nalidixique est utilisé pour sélectionner les *B. melitensis* et éliminer les *E. coli* S17 donneuses qui y sont sensibles.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

- **Contrôles :**

Une goutte (3 à 5 µl) d' *E. coli* S17 et de *Brucella* est déposée sur deux milieux sélectifs. Le premier contenant de l'acide nalidixique et le second contenant l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17 donneuses (résistance due au plasmide d'intérêt).

2.1.9 Transformation de bactéries CaCl₂ compétentes

Le but de l'opération est de faire pénétrer un plasmide à l'intérieur d'une bactérie dont la membrane a été rendue perméable à l'ADN par un traitement au CaCl₂ + glycérol 15%. La souche utilisée est *E. coli* DH10B.

- Ajouter 1 à 10 µl de la solution contenant le plasmide à 100 µl de cellules compétentes.
- Laisser sur glace pendant 30 minutes.
- Incuber les cellules à 42°C pendant 2 minutes (choc thermique).
- Ajouter 0, 5 ml de milieu LB.
- Incuber une heure à 37°C.
- Etaler de 50 à 100 µl de cellules sur LB Agar contenant l'antibiotique adéquat.

2.2 Techniques immunologiques

2.2.1 Préparation d'extraits protéiques totaux

- La veille, ensemercer 10 ml de culture dans du 2YT à une DO_{600nm} de 0, 05
- Incuber le temps désiré à 37°C sous agitation.
- Inactiver les *Brucella* 2 heures à 80°C.
- Centrifuger les cultures 15 minutes à 3000 rpm afin de culotter les bactéries.
- Resuspendre dans 1 ml de PBS (tableau 7)
- Quantifier les protéines en réalisant un dosage BCA

2.2.2 Dosage protéique BCA

La méthode de dosage BCA est une méthode colorimétrique utilisée pour évaluer la quantité de protéines dans les extraits totaux réalisés. Les réactifs réagissent avec les protéines de l'échantillon pour former un composé coloré. Les différences de couleur obtenues, reflétant le contenu en protéines, peuvent être mesurées par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550nm.

- **Méthode**

- On utilise une gamme d'étalonnage avec de la SAB (Sérum Albumine Bovine) de 0 à 1 mg/ml.
- On dépose des triplicats de 10 µl de chaque dilution dans une plaque multipuits ainsi que des triplicats de 10 µl des échantillons protéiques à doser.
- Ajouter à chaque puits 200 µl du mélange de réactifs A/B suivant le rapport 50:1.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Mesurer la densité optique à 550 nm.

- La droite étalon est tracée en plaçant sur l'axe des ordonnées les concentrations protéiques et sur l'axe des abscisses la DO_{550nm} correspondante. Connaissant la DO_{550nm} de chaque échantillon, leur concentration en protéines peut être calculée sur base de la droite étalon.
- Les échantillons sont alors tous mis à même concentration protéique.

- **Solutions et matériels**

- Toutes les mesures s'effectuent dans une plaque 96 puits (Sarstedt)
- BSA : Solution stock 10 mg/ml
- Réactif BCA : Kit Pierce BCA Reagent Kit Essay)

2.2.3. La technique du Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine parmi d'autres. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

- La séparation d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE).
- L'électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques.

2.2.3.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le principe de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La séparation se fait dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide (tableau 8). Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysées par du TEMED (tétraméthylidiamide). Suivant le pourcentage d'acrylamide choisi, on peut adapter la taille des pores du gel à la taille des protéines à séparer.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à séparer permet la rupture des ponts disulfures, formant des chaînes polypeptidiques complètement dénaturées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin (figure 2).

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation et le running gel ou gel de séparation. La technique de préparation du gel est reprise dans le tableau 9.

2.2.3.2. Préparation et chargement des échantillons

On veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes. Pour ce, il faut normaliser les échantillons selon leur concentration protéique grâce au dosage protéique BCA. On leur ajoute un tampon de chargement protéique dont la composition est reprise dans le tableau 10.

Ensuite, les échantillons sont bouillis 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines.

Enfin, les échantillons sont chargés sur le gel ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Low Range, Biorad). Ce dernier nous permettra de déterminer la taille des protéines détectées.

2.2.3.3 Migration

L'appareil est fixé sur 30 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel.

2.2.3.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-sec. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose, formant ainsi une réplique du gel (figure 3).

- **Protocole :**

- Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman aux dimensions du gel.
- Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert (tableau 11).
- L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (Biorad).
- Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 V et 14 V.
- La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent).

2.2.3.5. Immunodétection.

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase (une enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière), reconnaissant l'anticorps primaire permet de détecter la protéine d'intérêt (figure 4).

- **Etape de saturation**

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Pour cela, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans une solution de saturation (PBS-lait 5 % ; tableau 12). Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. La membrane est lavée trois fois dix minutes avec du PBS-Tween 0, 05%.

- **Incubation avec l'anticorps primaire**

La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS-lait 1% contenant l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt à la dilution adéquate, pendant une heure sous agitation. La solution contenant les anticorps est conservée à -20°C. La membrane est lavée trois fois avec du PBS-Tween 0, 05% pendant dix minutes.

- **Incubation avec l'anticorps secondaire**

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine F(c) de l'anticorps primaire. Il est conjugué à la peroxydase, enzyme permettant l'émission de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols.

L'anticorps secondaire utilisé Horse Radish Peroxidase (DAKO) est une IgG de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin.

La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par le fabricant dans du PBS - lait 1 % sous agitation pendant une heure.

La membrane est lavée trois fois avec du PBS - Tween 0, 05% pendant dix minutes.

- **Révélation**

La technique de détection utilise les réactifs ECL S1 et S2 (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

- La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal des deux solutions ECL: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir (surface en $\text{cm}^2 \times 0,125 \text{ ml}$).
- Incuber durant une minute.
- La solution de détection est éliminée et la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) est placée dans une cassette de révélation. Un film autoradiographique est alors exposé pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal obtenu.
- Les bandes d'intérêt sont révélées par un bain de révélateur (Kodak): le film est plongé dans la cuve pendant quelques minutes.
- Le film est placé une dizaine de secondes dans le fixateur, puis rincé abondamment à l'eau de ville et séché.

2.2.4 La technique du dot blot

On réalise des dilutions sériées de deux en deux de chaque échantillon à déposer. Deux μl de chaque dilution sont déposés et adsorbés sur une membrane de nitrocellulose. Puis, la membrane est traitée comme dans le protocole décrit pour le Western blot, après l'étape de transfert. Les anticorps et la dilution à laquelle ils sont utilisés sont représentés dans le tableau 13.

2.3 Techniques de microscopie

2.3.1 Préparation des extraits pour la microscopie électronique à balayage (MEB)

2.3.1.1 Fixation des bactéries sur le support choisi

On ensemence 1 ml de culture de *Brucella* à $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,05$ dans une plaque 6 puits contenant des godets de porosité 1 μm (Falcon). La plaque est mise sous agitation à 37°C le temps désiré. Puis, on centrifuge la plaque 15 minutes à 1000 rpm et on inactive les bactéries en les incubant 20 minutes avec 1 ml de PFA (paraformaldéhyde) 4%. On ajoute 1 ml de PBS par puits. Enfin, on découpe les membranes poreuses au fond des puits sur lesquelles les bactéries adhèrent et on les traite comme décrit ci-dessous pour pouvoir les observer au MEB.

2.3.1.2 Déshydratation des échantillons

Pendant son examen au microscope à balayage, l'échantillon est soumis à deux contraintes : le vide et le bombardement par des électrons. Les échantillons qui ne sont pas parfaitement secs tels les échantillons constitués de matériel biologique supportent mal ces contraintes, le liquide qu'il contiennent s'évapore lors du passage sous vide ce qui entraîne une déformation importante de l'échantillon.

Pour éviter cette déformation lors du séchage, l'échantillon est déshydraté par passage dans des bains d'alcool (éthanol) :

- 2 fois 5 minutes dans de l'éthanol 25 %
- 2 fois 5 minutes dans de l'éthanol 50 %
- 2 fois 10 minutes dans de l'éthanol 70 %
- 2 fois 10 minutes dans de l'éthanol 90 %
- Puis, les échantillons sont laissés dans de l'éthanol 100 %.

2.3.1.3 Point critique des échantillons

L'éthanol est ensuite remplacé par du CO_2 liquide dans une cuve sous pression. La température de la cuve est amenée à 38°C pour dépasser le point critique du CO_2 . Le CO_2 liquide se gazéifie. Il n'y a pas de tension sur l'échantillon lors de la disparition du liquide et donc pas de déformation.

Pour réaliser cela :

- Verser de l'éthanol 100 % dans la cuve de l'appareil
- Transférer les échantillons dans les cupules sans laisser sécher
- Allumer l'appareil et ouvrir la bonbonne CO₂
- Refroidir la chambre et laisser le gaz CO₂ à l'état liquide
- Echanger le mélange CO₂-éthanol par du CO₂. Cet échange doit se faire doucement pendant 20 minutes
- Fermer l'arrivée du CO₂ et chauffer la chambre.
- Evacuer doucement le gaz
- Coller les membranes sur les supports prévus pour le MEB et laisser sécher la nuit.

2.3.1.4 Dépôt d'or sur les échantillons

Lors de l'examen, l'échantillon subit un bombardement de charges électriques. S'il est isolant électrique, il va se charger négativement et repousser le faisceau d'électrons. Pour éviter cela, on dépose sur l'échantillon une fine couche d'or qui va éliminer les charges négatives.

Pour réaliser cela, on suit le protocole suivant :

- Déposer les échantillons collés sur le support dans l'appareil
- Faire le vide avec la pompe
- Ouvrir la bonbonne d'Argon (pression de 1 bar) et le faire entrer dans l'appareil
- Attendre que le vide se fasse
- Fermer le vide et la bonbonne
- Observer les échantillons au microscope électronique à balayage (Philips XL20) dont le principe est repris en annexe.

2.3.2 Préparation des extraits pour la microscopie à fluorescence

- **Appareillage :**

Le microscope employé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER.

- **Molécules fluorescentes utilisées :**

Nom	λ excitation en nm	λ émission en nm	Spécificité
Calcofluor	365 (UV)	435 (bleu)	polysaccharides
DAPI	350 (UV)	461 (bleu)	ADN
Iodure de propidium	518 (vert)	605 (rouge)	ADN
Concanavaline A - FITC	490 (bleu)	523 (vert)	Résidus α -mannopyranosyl et α -glucopyranosyl
Syto9	485 (bleu)	530 (vert)	ADN

NB : FITC est l'abréviation de la fluorescéine isothiocyanate.

- **Méthode :**

Les agrégats bactériens ont été prélevés dans un volume de 50 μ l de culture et transvasés dans un eppendorf. Suivant le marquage (simple ou double) utilisé, on ajoute 1 μ l d'iodure de propidium, 1 μ l de DAPI, 50 μ l de calcofluor 0,05%, 50 μ l de concanavaline A - FITC ou 1 μ l de Syto9 à ces 50 μ l de bactéries. On incube le mélange 10 minutes à 37°C dans l'obscurité, avant d'en monter 5 μ l entre lame et lamelle.

2.3.3 Préparation des extraits pour la microscopie confocale

Nous avons effectué un double marquage à l'iodure de propidium (pour marquer l'ADN des bactéries) et à la concanavaline A conjuguée au FITC.

- **Appareillage**

Le microscope employé est un Leica SP-1.

- **Stock de Concanavaline A-FITC**

Il est réalisé en resuspendant la lectine dans du tampon phosphate 10 mM pH 7.5 à une concentration finale de 1 mg/ml. La solution est alors aliquotée par 100 µl et stockée à -20°C à l'obscurité.

- **Double marquage des bactéries**

Dans un eppendorf, déposer 100 µl de suspension bactérienne et y ajouter 500 µl de PFA 4%.

- Incuber 20 minutes à température ambiante avant de centrifuger 5 minutes à 1000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de PBS ainsi que dans 50 µl de concanavaline A-FITC et 1 µl d'iodure de propidium.
- Incuber 30 minutes à l'obscurité avant de déposer 5 µl entre lame et lamelles. Le montage est soudé avec du VALAP (vaseline, lanoline, paraffine dans les proportions 1:1:1).
- Observer au microscope confocal dont le principe est repris en annexe.

2.4 Techniques relatives à l'étude des biofilms

2.4.1 Test d'adhérence

On inocule des cultures liquides de 2YT à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures d'une nuit de *Brucella* en 2YT.

Puis, des triplicats de 1 ml de chaque culture sont déposés dans une plaque 24 puits ou de 100 µl dans une plaque 96 puits en polystyrène stérile. On incube 20 heures à 37°C sous agitation avant d'aspirer le surnageant.

Les puits sont lavés délicatement avec 1 ml d'eau stérile que l'on aspire ensuite sans toucher le fond de la plaque.

On ajoute 1 ml de cristal violet 0,05 % (en eau) à chaque puits.

On incube 2 minutes avant de laver les puits trois fois avec de l'eau.

Aspirer le colorant et observer le fond de chaque puits.

Pour doser la quantité de colorant fixée par les bactéries, solubiliser le cristal violet fixé dans 1 ml d'éthanol 100 % et prendre la DO_{596nm} du colorant ainsi récupéré.

2.4.2 Extraction des exopolysaccharides de Brucella

- Ensemencer 200 ml de culture de *Brucella* dans du 2YT à une DO_{600nm} de 0,05 et incuber 20 heures sous agitation à 37°C
- Inactiver les cultures 15 minutes à 100°C afin d'inhiber les enzymes qui pourraient dégrader les exopolysaccharides
- Centrifuger les cultures inactivées 20 minutes à 8000 rpm à 4°C
- Doser les protéines par la technique BCA sur les culots repris dans 1 ml de PBS.
- Précipiter les surnageants dans une bouteille en verre avec 3 volumes d'éthanol 95% froid. Laisser précipiter les exopolysaccharides toute la nuit à 4°C.
- Centrifuger le contenu des bouteilles 20 minutes à 8000 rpm à 4°C.
- Rassembler les culots d'une même souche en les resuspendant dans un volume final identique d'eau distillée (5 ml).
- Afin de perdre les monomères saccharidiques de l'échantillon, on le dialyse pendant une journée à 4°C contre un litre d'eau distillée. La membrane de dialyse appropriée a un cut-off de 1000 Da.
- Récupérer la solution dans le boudin à dialyse
- Doser les sucres totaux selon la méthode de dosage de Dubois

2.4.3 Dosage des sucres par la méthode de Dubois

- **Principe**

Sous l'action de l'acide sulfurique concentré, les polyosides sont hydrolysés en oses neutres et en acides uroniques. Les monomères libérés déshydratés en dérivés furfuroïques forment avec le phénol un complexe de couleur jaune présentant un maximum d'absorbance à 490 nm (hexoses). Les acides uroniques et les pentoses donnent une absorbance maximale à 480 nm.

- **Protocole**

Au préalable, on nettoie des tubes en verre avec de l'acide sulfurique concentré.

- Réaliser une droite d'étalonnage à partir d'une gamme de concentration de glucose de 0 à 200 mg/l
- Déposer dans une éprouvette 400 µl d'échantillon à doser, 10 µl de phénol 80 % et 1 ml d'acide sulfurique concentré
- Laisser reposer 10 minutes à 25°C
- Agiter
- Incuber 10 à 20 minutes à 25°C
- Lire l'absorbance à 490 nm (hexoses) et 480 nm (pentoses)

2.4.4 Dosage des sucres à l'anthrone

Pour réaliser ce dosage, il faut établir une droite d'étalonnage à partir d'une gamme de concentration de glucose (allant de 0 à 200 mg/l) en même temps que le dosage des échantillons. Un volume de 400 µl des dilutions de glucose et des échantillons sont déposés dans des tubes en verre rincés à l'acide sulfurique. Il faut ajouter 800 µl d'anthrone (à préparer en dissolvant 0,2 g d'anthrone dans 100 ml d'H₂SO₄ pur) à chaque échantillon. Ensuite, les tubes sont mélangés prudemment avant d'être incubés 10 minutes à 37°C. Une fois ce temps écoulé, il faut mesurer la densité optique des échantillons à 620 nm.

2.4.5 Extraction du LPS au phénol

Cette méthode est habituellement utilisée pour extraire le LPS d'un échantillon. Pour y parvenir, il faut faire chauffer les échantillons à 66°C d'une part et un volume équivalent de phénol d'autre part. Lorsque les deux ont atteint cette température, le phénol chaud est additionné aux échantillons. Cette solution est alors chauffée 15 minutes à 66°C en étant mélangée de temps en temps. Une fois ce temps écoulé, le mélange est refroidi sur glace. Puis, la solution est centrifugée à froid 15 minutes à 9000 rpm. On obtient une solution répartie en deux phases : la phase aqueuse supérieure contient les EPS de *Brucella* (dans le cadre de cette étude) tandis que le LPS est repris dans la phase organique inférieure.

2.4.6 Hydrolyse acide des exopolysaccharides

Cette expérience permet d'hydrolyser des polymères sucrés en monomères afin de permettre, par exemple, une analyse par HPLC ou par TLC. Pour cela, il faut mélanger 1 ml de chaque échantillon sucré avec 200 µl de TFA 2M (acide tri-fluoro acétique). Ce mélange est chauffé deux heures à 100°C pour ensuite se faire neutraliser par 1 ml de NaOH 2M. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 minutes à 13000 rpm à 4°C. Les surnageants sont récoltés et les monomères des échantillons hydrolysés peuvent être identifiés par HPLC.

2.4.7 Analyse des hydrates de carbone par HPLC (chromatographie liquide à haute pression)

Cette technique comprend deux étapes : la séparation des hydrates de carbone sur la colonne Carbo Pac PA100 et leur détection par ampérométrie pulsée après leur passage dans la colonne.

- **Séparation**

Les hydrates de carbone possèdent des groupements hydroxyles très stables et c'est seulement à pH élevé (12 à 14) que les sucres sont partiellement ou complètement chargés négativement. Ils peuvent alors être séparés par échange anionique. La colonne utilisée est une résine pelliculaire (de polystyrène-divinylbenzène) sur laquelle sont greffés des groupements SO_3^- (sulfites) et des groupements NR_3^+ (amines). Les sucres à doser sont chargés négativement dans une solution de NaOH 20mM.

Plus les chaînes des sucres sont longues, plus les charges négatives sont nombreuses et plus elles sont retenues sur la colonne. L'élution se réalise avec un gradient de NaOH et d'acétate de sodium 500mM (voir tableau 14).

- **Détection**

La détection ampérométrique pulsée utilise une séquence répétée de trois potentiels (E1, E2, E3) appliqués pendant une durée spécifique (t1, t2, t3) au niveau d'une électrode en or placée à la sortie de la colonne.

E1 est le potentiel auquel est mesuré le courant résultant de l'oxydation des hydrates de carbone pendant le temps t1.

E2 a un potentiel positif afin de « nettoyer » électrochimiquement la surface de l'électrode

E3 a un potentiel négatif afin de réduire l'oxyde d'or ou or métallique.

2.4.8 Test live/dead

Il s'agit d'un test de viabilité de bactéries basé sur la perméabilité de leur membrane et sur deux molécules fluorescentes : l'iodure de propidium (émettant dans le rouge) et le syto9 (émettant dans le vert). Le syto9 est une molécule fluorescente spécifique de l'ADN à laquelle les membranes bactériennes sont perméables. Inversement, l'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN auquel les bactéries vivantes ne sont pas perméables. Les bactéries apparaissant rouges sont donc considérées comme mortes tandis que celles marquées en vert sont considérées comme vivantes. En calculant le nombre de bactéries rouges par rapport au nombre de vertes, on estime la proportion de bactéries mortes dans la population.

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le kit « LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability » (Invitrogen) en ajoutant 1 μl d'iodure de propidium et 1 μl de Syto9 à 100 μl de bactéries. Ensuite, incubé 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité, monter 5 μl de ce mélange entre lame et lamelle et observer au microscope à fluorescence en utilisant les bons filtres de longueurs d'onde. Le principe de la microscopie à fluorescence est repris en annexe.

2.5 Annexes

2.5.1 Principe de la microscopie à fluorescence

Cette technique exploite la capacité qu'ont certaines molécules (fluorochromes) d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement (<1 nanoseconde) sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Cependant, du fait de l'absorption d'une partie de l'énergie par d'autres molécules du milieu (phénomène de quenching) et d'une perte sous forme de chaleur, l'énergie de la lumière réémise est plus faible que celle qui a été absorbée, ce qui se traduit par une augmentation de la longueur d'onde. Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifique délivré par le fluorochrome.

Dans un microscope à fluorescence (figure 5), la lumière émise par une source de lumière blanche est filtrée pour isoler la longueur d'onde qui va exciter l'échantillon, puis focalisée sur la zone d'observation de l'objectif. La lumière émise est captée par l'objectif et filtrée pour isoler les longueurs d'onde parasites qui pourraient brouiller le signal, puis observée.

2.5.2 Principe de la microscopie confocale

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale pallie ces inconvénients, puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan.

Un rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorochromes. Il y a alors émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de l'échantillon. Grâce à un diaphragme variable (ou pinhole) qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de l'échantillon. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage de longueur d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateur (figure 6).

La microscopie confocale offre plusieurs avantages :

- Elle élimine le signal de fluorescence provenant des autres plans grâce au pinhole.
- Elle permet l'observation simultanée de plusieurs sondes fluorescentes
- Elle dispose de réglages électroniques du contraste, de la luminosité et de l'agrandissement
- Elle permet l'acquisition de séries de sections optiques permettant une reconstitution tridimensionnelle.

2.5.3 Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)

Le principe du MEB consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident.

Il est constitué d'une enceinte sous vide où un faisceau électronique est mis en forme par des lentilles électromagnétiques pour exciter l'objet à étudier (figure 7). Le faisceau d'électrons est focalisé sur la surface de l'échantillon sous forme d'une tache (*spot*), déplacée ligne par ligne de façon à balayer une surface rectangulaire.

La source d'électrons est un filament de tungstène parcouru par un courant de chauffage. Le wehnelt, plaque percée d'un orifice et portée à une tension positive de quelques centaines de Volts, est placée à proximité de la pointe du filament. L'accélération des électrons est réalisée par une deuxième plaque percée également d'un orifice, et portée à un potentiel ajustable. Les lentilles magnétiques rendent convergent le faisceau d'électrons sur l'échantillon (figure 7). Des bobines en *x* et en *y* permettent de déplacer le pinceau électronique à la surface de l'échantillon.

Un certain nombre d'électrons du faisceau rebondissent sur l'objet, d'autres lui arrachent quelques électrons. Ces électrons secondaires ont une faible énergie cinétique et pour qu'ils ressortent de l'échantillon, il faut qu'ils soient émis près de la surface de ce dernier. De ce fait, ils sont très sensibles à la topographie de l'échantillon. Les électrons secondaires sont détectés à l'aide d'un détecteur formé d'un scintillateur (qui absorbe les électrons et restitue une partie de leur énergie sous forme de photons) associé à un photomultiplicateur qui convertit ensuite les photons en électrons par effet photoélectrique (figure 7). Le faisceau est alors déplacé par le bobinage de déflexion sur le point suivant de l'objet et tout le processus se répète jusqu'à obtenir une image complète à l'écran. Le détecteur possède une grille métallique portée à un potentiel positif qui accroît l'attraction des électrons secondaires.

Le pouvoir de résolution d'un microscope est au mieux égal à la longueur d'onde du rayonnement qu'il utilise. Un microscope photonique permet de distinguer des points distants d'environ un micromètre. Si on utilise des électrons accélérés comme rayonnement, le pouvoir de résolution devient jusqu'à mille fois plus grand. Le microscope électronique à balayage a un pouvoir de résolution de l'ordre de 10 nm.

2.5.4 Test blanc/bleu

Ce test permet de détecter facilement les bactéries DH10B portant un plasmide recombinant. En effet, les éléments génétiques portés par la souche DH10B ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Il peut néanmoins y avoir une complémentation intragénique avec un plasmide apportant *LacI* (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal, substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Quand le test est blanc, il met en évidence les bactéries ayant acquis un plasmide qui contient un insert au niveau du site multiple de clonage car celui-ci disruptive le gène *lacZ'* ; la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. Quand le test est bleu, la β -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ* car il inhibe *lacI* (voir figure 8).

2.5.5 Protocole de minipréparations d'ADN plasmidique

- Ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1, 5 ml de la culture liquide dans un eppendorf à 14000 rpm pendant 10 minutes, puis éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 μ l de S1.
- Ajouter 300 μ l de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement par retournements, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 μ l de S3 et mélanger doucement par retournements, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol, vortexer.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70 % froid pour le lavage.
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Eliminer prudemment le surnageant.
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 20 μ l d'H₂O distillée stérile.
- Stocker à -20°C.

2.5.6 Protocole purification sur gel d'agarose

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel et peser le morceau d'agar
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 μ l de cette solution de silice par μ g d'ADN; passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant et ajouter au culot 500 μ l de solution de lavage du kit
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 μ l d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant et conserver l'ADN à - 20°C.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. & Maier, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3262-8 (2000).
- Atkinson, S., Throup, J. P., Stewart, G. S. & Williams, P. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* **33**, 1267-77 (1999).
- Bauer, W. D. Eukaryotes Deal with Bacterial Quorum Sensing. *ASM News* **71**, 129-135 (2005).
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Lavigne, J. P., Liautard, J. P., Ramuz, M. & O'Callaghan, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* **90**, 341-8 (2002).
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J. P., Ramuz, M. & O'Callaghan, D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1544-9 (2002).
- Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2355-9 (1994).
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**, 20-6 (2005).
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56 (2003).
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. & Hughson, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**, 545-9 (2002).
- Choi, S. H. & Greenberg, E. P. Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* **174**, 4064-9 (1992).
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**, 2137-42 (1994).
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-22 (1999).
- D'Haeze, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M. & Carlson, R. W. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol Microbiol* **52**, 485-500 (2004).
- Davey, M. E. & O'Toole, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847-67 (2000).
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Igilewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-8 (1998).
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3526-31 (2000).
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-93 (2002).
- Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881-90 (2002).

- Federle, M. J. & Bassler, B. L. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**, 1291-9 (2003).
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-51 (1996).
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-75 (1994).
- Gilson, L., Kuo, A. & Dunlap, P. V. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**, 6946-51 (1995).
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**, 6618-22 (1996).
- Gonzalez, J. E. & Marketon, M. M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 574-92 (2003).
- Gonzalez, J. E., York, G. M. & Walker, G. C. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**, 141-6 (1996).
- Greenberg, E. P. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *ASM News* **63**, 371-377 (1997).
- Hammer, B. K. & Bassler, B. L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**, 101-4 (2003).
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**, 5766-70 (1999).
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J. & Greenberg, E. P. Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**, 4882-7 (1997).
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* **14**, 648-56 (2004).
- Hoang, H. H., Becker, A. & Gonzalez, J. E. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* **186**, 5460-72 (2004).
- Johnson, M. R., Montero, C. I., Connors, S. B., Shockley, K. R., Bridger, S. L. & Kelly, R. M. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol* **55**, 664-74 (2005).
- Kaplan, H. B. & Greenberg, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**, 1210-4 (1985).
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**, 895-904 (1997).
- Kuchma, S. L., Connolly, J. P. & O'Toole, G. A. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1441-54 (2005).
- Kumamoto, C. A. & Vines, M. D. Alternative *Candida albicans* Lifestyles: Growth on Surfaces. *Annu Rev Microbiol* (2004).
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. & Williams, P. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** (Pt 10), 2469-80 (2000).
- Lawrence, R. N., Dunn, W. R., Bycroft, B., Camara, M., Chhabra, S. R., Williams, P. & Wilson, V. G. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, N-(3-

- oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* **128**, 845-8 (1999).
- Lazazzera, B. A. & Grossman, A. D. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* **6**, 288-94 (1998).
- Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 581-92 (2004).
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6 (2000).
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Givskov, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**, 1119-27 (2002).
- Marketon, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A. & Gonzalez, J. E. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **185**, 325-31 (2003).
- Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A. & Gonzalez, J. E. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* **184**, 5686-95 (2002).
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1444-9 (2003).
- Matthysse, A. G., Holmes, K. V. & Gurlitz, R. H. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol* **145**, 583-95 (1981).
- Mendrygal, K. E. & Gonzalez, J. E. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**, 599-606 (2000).
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-99 (2001).
- Mok, K. C., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *Embo J* **22**, 870-81 (2003).
- Nealson, K. H. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* **112**, 73-9 (1977).
- Nielsen, P. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat. Sci. Tech* **36**, 11-19 (1997).
- O'Callaghan, D. M. Brucella. Animal and Ectoparasitic source infections. 1991-2010 (2001).
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79 (2000).
- Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27-33 (2005).
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4360-5 (1999).
- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-10 (1999).
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-34 (1999).
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127-32 (1997).
- Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S. & Schaefer, A. L. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **179**, 7530-7 (1997).

- Qin, Y., Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Beck von Bodman, S. & Farrand, S. K. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J* **19**, 5212-21 (2000).
- Reckseidler-Zenteno, S. L., DeVinney, R. & Woods, D. E. The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition. *Infect Immun* **73**, 1106-15 (2005).
- Ridout, M. J., Brownsey, G. J., York, G. M., Walker, G. C. & Morris, V. J. Effect of o-acyl substituents on the functional behaviour of *Rhizobium meliloti* succinoglycan. *Int J Biol Macromol* **20**, 1-7 (1997).
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-54 (2002).
- Sherlock, O., Vejborg, R. M. & Klemm, P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* **73**, 1954-63 (2005).
- Shirtliff, M. E., Mader, J. T. & Camper, A. K. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* **9**, 859-71 (2002).
- Smith, R. S., Harris, S. G., Phipps, R. & Iglewski, B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* **184**, 1132-9 (2002).
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8951-6 (2003).
- Stevens, A. M., Fujita, N., Ishihama, A. & Greenberg, E. P. Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J Bacteriol* **181**, 4704-7 (1999).
- Sutherland, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9 (2001).
- Sutherland, I. W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**, 222-7 (2001).
- Sutherland, I. W. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Sci Technol* **43**, 77-86 (2001).
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. & Letesson, J. J. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **70**, 3004-11 (2002).
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42 (1998).
- Van Delden, C. & Iglewski, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**, 551-60 (1998).
- Vannini, A., Volpari, C. & Di Marco, S. Crystal structure of the quorum-sensing protein TraM and its interaction with the transcriptional regulator TraR. *J Biol Chem* **279**, 24291-6 (2004).
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. & Marco, S. D. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J* **21**, 4393-401 (2002).
- Visick, K. L. & McFall-Ngai, M. J. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *J Bacteriol* **182**, 1779-87 (2000).

- von Bodman, S. B., Majerczak, D. R. & Coplin, D. L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7687-92 (1998).
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H. & Zhang, L. H. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* **279**, 13645-51 (2004).
- Webb, J. S., Givskov, M. & Kjelleberg, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol* **6**, 578-85 (2003).
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. & Kjelleberg, S. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**, 4585-92 (2003).
- Welch, M., Todd, D. E., Whitehead, N. A., McGowan, S. J., Bycroft, B. W. & Salmond, G. P. N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *Embo J* **19**, 631-41 (2000).
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487 (2002).
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-4 (2001).
- Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 661-71 (2000).
- Winans, S. C. & Bassler, B. L. Mob psychology. *J Bacteriol* **184**, 873-83 (2002).
- Xun, L. Y., Mah, R. A. & Boone, D. R. Isolation and characterization of disaggregatase from *Methanosarcina mazei* LYC. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3693-8 (1990).
- Zerfas, P. M., Kessel, M., Quintero, E. J. & Weiner, R. M. Fine-structure evidence for cell membrane partitioning of the nucleoid and cytoplasm during bud formation in *Hyphomonas* species. *J Bacteriol* **179**, 148-56 (1997).
- Zhang, L. H. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* **8**, 238-44 (2003).
- Zhu, J. & Winans, S. C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1507-12 (2001).